

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hünig

Identifizierung neuer Dengue Virus Typ-2 Proteaseinhibitoren

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Mariya Snitko
aus Würzburg

Würzburg, September 2014



Referent: Priv.-Doz. Dr. Jochen Bodem

Korreferent: Prof. Dr. Kai Schuh

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2015

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Dengue. Allgemeine Grundlagen	1
1.1.1 Klassifizierung, weltweite Verbreitung, Übertragungsweg, klinische Manifestation, Therapie	1
1.1.1.1 Virusübertragung und Krankheitsverlauf	5
1.1.1.2 Dengue Fieber.....	6
1.1.1.3 Hämorrhagisches Denguefieber und Dengue Schock Syndrom	6
1.1.1.4 Therapie	7
1.1.2 Morphologie, Genom, Fusions- und Replikationsmechanismus	7
1.2 Dengue Protease	10
1.2.1 Struktur und Funktion der NS2B-NS3pro-Protease.....	10
1.3 DENV-Protease-Inhibitoren.....	12
1.3.1 Untersuchung von klassischen Serin-Protease-Inhibitoren	12
1.3.2 Untersuchung von Peptid Inhibitoren	12
1.4. Weitere mögliche antflavivirale Medikamente	14
1.4.1 DENV RNA-Polymerase-Inhibitor NITD008.....	14
1.4.2 DENV Entry-Inhibitoren.....	14
1.4.3 Zyklophiline als möglicher Angriffspunkt für die antflaviviralen Medikamente.....	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Enzyme.....	17
2.1.3 Kits	17
2.1.4 Oligonukleotide	17
2.1.5 Expressionsvektoren	18
2.1.6 Bakterienstämme (transformationskompetent)	18
2.1.7 Zelllinien.....	18
2.1.8 Antiseren	18

2.1.8.1 Primäre Antikörper	18
2.1.8.2 Sekundäre Antikörper.....	18
2.1.9 Größenstandards	18
2.1.9.1 DNA-Standards	18
2.1.9.2 Protein-Standards	18
2.1.10 Lösungen, Puffer, Medien.....	19
2.1.10.1 Bakterienkultur	19
2.1.10.2 Puffer und Lösungen für DNA-Analysen und Klonierungen	19
2.1.10.2.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. Coli</i>	19
2.1.10.2.2 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Mini-Präp)	19
2.1.10.2.3 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxi-Präp)	19
2.1.10.2.4 Agarosegel-Elektrophorese	20
2.1.10.3 Puffer und Lösungen für Syntheseinduktion, Aufreinigung und Analyse von Proteinen.....	20
2.1.10.3.1 Puffer für die denaturierende Proteinaufreinigung.....	20
2.1.10.3.2 Puffer für die native Proteinaufreinigung	20
2.1.10.3.3 SDS-PAGE	21
2.1.10.3.4 Coomassie-Blau-Färbung.....	21
2.1.10.3.5 Western-Blot.....	21
2.1.10.3.6 Dialysepuffer	21
2.1.10.3.7 Modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford	22
2.1.10.3.8 Puffer für photometrische Analyse der Dengue-NS3pro-Protease....	22
2.1.10.3.9 Puffer für fluorometrische Analyse der Dengue-NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease.....	22
2.1.10.4 Lösungen für Kultivierung von adhärenenten Zellen.....	22
2.1.10.5 Lösungen für Zellkulturanalyse	22
2.1.11 Inhibitoren	23
2.2 Methoden	23
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.1.1 DNA-Amplifikation mit Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.2.1.2 DNA-Aufreinigung mit PureLink™ PCR Purification Kit.....	24
2.2.1.3 Klonierung von PCR-Produkten	25
2.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	25

2.2.1.5 Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	26
2.2.1.6 Kultivierung und Konservierung von Bakterien	26
2.2.1.7 Minipräparation von Plasmid-DNA	26
2.2.1.8 Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	28
2.2.1.9 Absorptionsspektrometrische Bestimmung des Nukleinsäuregehalts...	28
2.2.1.10 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	29
2.2.1.11 Analyse von DNA mit Hilfe von Agarosegel-Elektrophorese.....	30
2.2.1.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.2.1.13 Dephosphorylierung von 5'-Enden	32
2.2.1.14 Ligation linearer DNA-Fragmente.....	32
2.2.1.15 Sequenzierung von DNA.....	33
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	34
2.2.2.1 Herstellung des proteinsequenztragenden Klons, Vermehrung der klon- tragenden Bakterien, Induktion der Proteinsynthese	34
2.2.2.2 Denaturierende Proteinaufreinigung	36
2.2.2.3 Native Proteinaufreinigung.....	37
2.2.2.4 Analyse der Proteine in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen	37
2.2.2.5 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau	39
2.2.2.6 Western-Blot-Analyse von Proteinen	39
2.2.2.7 Dialyse von Proteinlösungen.....	40
2.2.2.8 Bestimmung des Proteingehalts (modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford)	41
2.2.3 Zellbiologische, virologische, enzymkinetische Methoden.....	41
2.2.3.1 Kultivierung von adhärennten Zellen	41
2.2.3.2 Zelldichtebestimmung und Animpfung von Zellkulturplatten.....	42
2.2.3.3 Vermehrung von DENV2 in Vero-Zellen	42
2.2.3.4 Fixierung von Zellen.....	43
2.2.3.5 Methoden zur Analyse von Proteaseinhibitoren <i>in vivo</i>	43
2.2.3.5.1 Bestimmung der Zytotoxizität von DENV2-Protease-inhibitoren.....	43
2.2.3.5.2 Beurteilung der Wirkung von DENV2-Proteaseinhibitoren mit Hilfe von Immunhistochemie und Fluorometrie	44
2.2.3.5.2.1 Visuelle Beurteilung.....	44
2.2.3.5.2.2 Fluoreszenzmessung	45

2.2.3.6 Methoden zur Analyse von Proteaseinhibitoren <i>in vitro</i>	46
2.2.3.6.1 Grundlagen der Enzymkinetik	46
2.2.3.6.2 Aktivitätsprüfung von Enzymen	49
2.2.3.6.2.1 Photometrische Analyse.....	49
2.2.3.6.2.1.1 „Assay“-Bedingungen für Photometrische Analyse der Den- gue-NS3pro-Protease ohne Kofaktor.....	49
2.2.3.6.2.2 Fluorometrische Analyse.....	50
2.2.3.6.2.2.1 „Assay“-Bedingungen für flourometrische Analyse der Dengue- NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease	50
2.2.3.6.2.2.2 Km-Bestimmung.....	51
2.2.3.6.3 Fluorimetrische Analyse von Proteaseinhibitoren	51
2.2.3.6.3.1 Inhibitorentestung.....	51
2.2.3.6.3.2 Korrekturmessung	52
2.2.3.6.3.3 Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes	53
2.2.3.6.3.4 Bestimmung von Km und Vmax, Auftragung nach Lineweaver-Burk und Beurteilung der Wirkungsweise.....	54
3. Ergebnisse	56
3.1. Herstellung der DENV2-Proteasese	56
3.1.1 Herstellung der DENV2-Protease mit dem kompletten NS2B-Kofaktor	56
3.1.1.1 PCR-Amplifizierung von DENV2-Proteasesequenzen, Herstellung des DENV2-Protease kodierenden Klons, Expression und Aufreinigung der Protease	56
3.1.2 Expression und Aufreinigung des NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Proteasen- konstruktes von DENV2.....	61
3.2 Aktivitätsprüfung der DENV2-Protease	63
3.3 Identifizierung neuer DENV2-Proteaseinhibitoren.....	66
3.3.1 Suche nach einer passenden Substanzklasse	66
3.3.2 Testung von FM 47 und TP 38 Derivaten.....	70
3.3.3 Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes ausgewählter Inhibitoren.....	72
3.3.4 Beurteilung der Wirkungsweise ausgewählter Inhibitoren	73
3.3.5 Analyse ausgewählter FM 47 und TP 38 Derivate <i>in vivo</i>	75
3.3.5.1 Bestimmung der Zytotoxizität	75

3.3.5.3 Beurteilung der Proteaseinhibitoren <i>in vivo</i> mit Hilfe von Immunhisto- chemie und Fluorometrie.....	78
3.3.5.3.1 Visuelle Beurteilung der viralen Replikation	78
3.3.5.3.2 Fluoreszenzmessung	81
4.1 Entwicklung antiviraler Substanzen	84
4.2 Methoden zur Entwicklung antiviraler Substanzen	84
4.3 Prozessierung des Vorläuferproteins	86
5. Zusammenfassung.....	88
6. Literaturverzeichnis.....	89
7. Anhang	100
7.1 Inhibitorenverzeichnis.....	100
7.2 Abbildungsverzeichnis	122
7.3 Tabellenverzeichnis	125

1. Einleitung

1.1 Dengue. Allgemeine Grundlagen

1.1.1 Klassifizierung, weltweite Verbreitung, Übertragungsweg, klinische Manifestation, Therapie

Das Dengue Virus ist ein behülltes Einzel-(+)-Strang-RNA-Arbovirus, das zur Genus *Flavivirus* der Familie *Flaviviridae* gehört (1). Sein Hauptüberträger ist die Gelbfiebermücke (*Aedes aegypti*), aber auch andere Mückenarten, wie z.B. die Asiatische Tigermücke (*Aedes albopictus*), Polynesische Tigermücke (*Aedes polynesiensis*) oder *Aedes scutellaris* waren an Ausbrüchen von Dengueinfektion beteiligt (2).

Familie	Genus	Spezies
Flaviviridae	Flavivirus	Dengue Virus Gelbfieber Virus Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus West-Nile-Virus Japanische B-Enzephalitis Virus Tick-borne Enzephalitis Virus (TBEV) u.a.
	Hepacivirus	Hepatitis C Virus
	Pestivirus	Bovine Viral Diarrhea Virus 1 Bovine Viral Diarrhea Virus 2 Classical Swine Fever Virus (CSFV) Border Disease Virus (BDV)

Tabelle 1: Familie Flaviviridae (3)

Das Dengue Virus (DENV) ist der Verursacher des Dengue Fiebers (DF), Dengue hämorrhagischen Fiebers (DHF) und Dengue Schock Syndroms (DSS). Etwa 40% der Weltbevölkerung (ca. 2,5 Milliarden Menschen) sind durch das Virus bedroht, da sie in den Ausbreitungsgebieten des Vektors leben (Abb. 1) (2, 4, 5).

Vor allem tropische und subtropische Klimazonen sind von der Dengueinfektion betroffen. Ungefähr 1,8 Milliarden Betroffenen leben in den Ländern Süd-Ost-Asiens und des westlichen Pazifiks (Abb.1). Dort werden ca. 75 % aller Denguefälle registriert. Besonders betroffen sind Indien, Myanmar, Thailand, Sri Lanka und Indonesien (mit der höchsten Inzidenz von 157442 Fälle im Jahr 2007 und der gebietsweise höchsten Sterberate von bis zu 5 %) (6, 7). In Kambodscha, Malaysia, Vietnam und auf den Philippinen wurden in den Jahren 2012-2013 593904 DF-Fälle mit 1660 Todesfällen registriert (8).

Es gibt keine genauen Angaben über die Anzahl der Dengue-Ausbrüchen und die Anzahl der Betroffenen in Afrika. Bis jetzt wurde über DENV-Epidemien in Kenia, Mosambik, Somalia, Seychellen, Dschibuti, Nigeria, Burkina-Faso, Sansibar, Senegal, Réunion, auf den Komoren und den Kap Verdischen Inseln berichtet (9-11) (Abb.1).

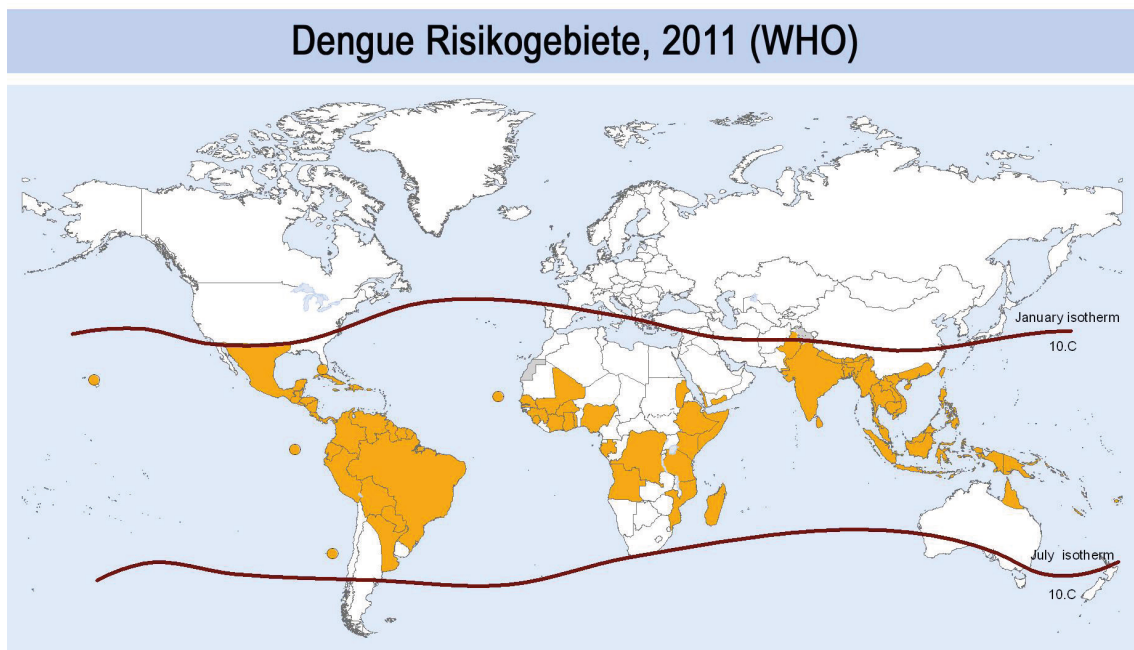


Abbildung 1: Regionen mit Dengue Transmissionsrisiko. Weltweite Verteilung des Dengue Infektionsrisikos. Gelb sind Länder mit gemeldeten Dengue Fällen gekennzeichnet. Die beiden Linien sind die Januar- und Juli-Isothermen. Sie grenzen die Gebiete ab, wo die Vektormücke *Aedes aegypti* das ganze Jahr über überleben kann und repräsentieren somit den Raum mit möglicher Denguetransmission (12). (Bild übernommen aus WHO map production 2012)

Die am stärksten betroffenen Länder in Zentral- und Südamerika sind Honduras, Costa Rica, Venezuela, Brasilien und Paraguay. Im Jahr 2007 wurden in der westlichen Hemisphäre mehr als 900000 Fälle von DF und mehr als 26000 Fälle von DHF

registriert, wobei allein 500000 Neuinfektionen aus Brasilien gemeldet wurden. Seit 1955 wurde in den Ländern wie Bolivien, Costa Rica, El Salvador, Teilen von Karibik und den USA eine Zunahme der Inzidenz um mehr als 100 % beobachtet (Abb.2) (5, 13, 14).



Abbildung 2: Ausbreitung von DENV3 in Lateinamerika in den Jahren 1994-2001. (Bild übernommen aus CDC EID journal July 2003, Volume 9, p. 807)

2007 betrug die Zahl der Infizierten in den USA 488 Menschen im Vergleich zu 1995 mit nur 7 Dengue Infektionen. Dabei handelte es sich allerdings um Reiseinfektionen. Bereits 2009 wurde allerdings über die ersten Fälle der lokalen Dengue Infektion in Key West Florida berichtet (5). Inzwischen wurde das Vorkommen des Vektors *Aedes aegypti* in 21 Staaten der USA registriert. In manchen Staaten erreichen die Wintertemperaturen einen Tiefstwert von -20°C . Da die Mücken kältesensibel sind, überleben sie dort vermutlich an von Kälte geschützten Orten. Dies macht ihre Ausbreitung auch in Europa möglich (15). In Dengue Endemiegebieten ist die Mehrheit der erwachsenen Bevölkerung DENV-seropositiv (16). Die Sterberate an DHF beträgt ca. 5 %. Bei einer rechtzeitig eingeleiteten adäquaten symptomatischen Therapie kann diese auf etwa 1 % reduziert werden (17). Besonders betroffen sind Kinder und junge Erwachsene (18).

Die Mehrheit der Betroffenen sind Bewohner der tropischen Großstädte. Hier

dienen die offenstehenden Wasserreservoirare als Brutplätze für die DENV-Vektoren *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus*. Die Mücken sind tagaktiv, weshalb Mosquitonetze keinen ausreichenden Schutz bieten. Auch Insektizide sind bei der Mückenbekämpfung wenig effektiv (15). Die hohe Bevölkerungsdichte trägt zur Ausbreitung der Mücken bei und führt zu explosionsartigen Endemien. Zum Beispiel 1988 sind in Guayaquil (Ecuador) innerhalb von vier Monaten 420000 DF-Fälle gemeldet worden (19, 20). Auch ländliche Regionen bleiben auch nicht ausgespart. Seit 2007 wird in Kambodscha eine Zunahme der Neuinfektionen auf dem Land beobachtet (2).

In Europa ist DENV bisher nicht heimisch. Im Jahr 1928 kam es jedoch mit über 600000 Erkrankten und 1000 Toten in Athen und Piräus zu einem der größten je erfassten Dengue-Ausbrüch (21). Seit etwa 1990 ist die Tigermücke (*Aedes albopictus*) in Italien zu finden. In den folgenden 20 Jahren hat sie sich über 82 von 107 Provinzen ausgebreitet (Abb. 3) (22). Auch in Südfrankreich hat sich diese Spezies etabliert (Abb. 3). Dort wurde 2010 über den ersten autochthonen Fall von DF berichtet (23). Somit ist eine Transmission des DENV in Europa bereits möglich. Die Transmissionswahrscheinlichkeit könnte steigen, sobald der Vektor den nördlichen Teil Europas besiedelt hat. Auch die Etablierung des *Aedes aegypti* in Europa wird als nicht unwahrscheinlich angesehen (15).

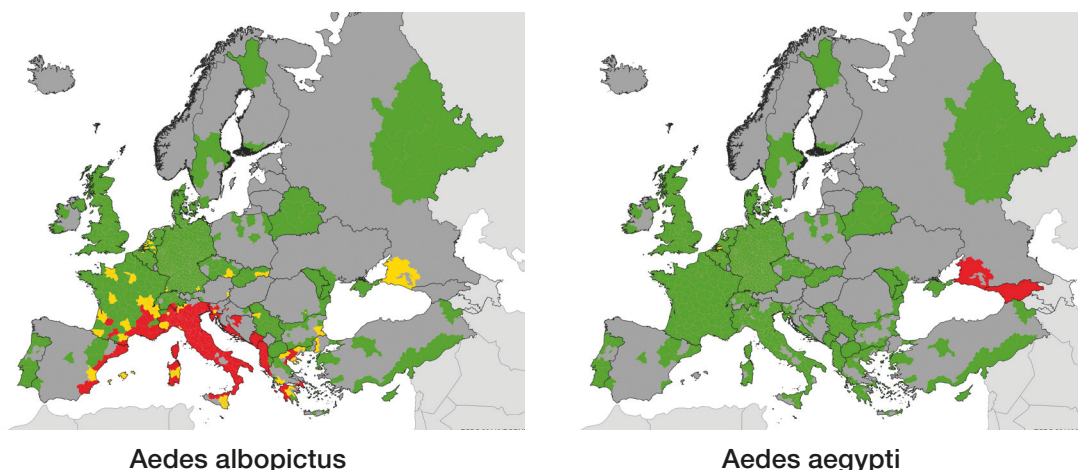


Abbildung 3: Verbreitung von *Aedes albopictus* und *Aedes aegypti* in Europa, Jan. 2014
Ausbreitung von überwinterten Populationen: rot - etabliert, gelb – seit Kurzem vorhanden; Spezies wurden in den letzten 5 Jahren in mindestens einem Stadtbezirk beobachtet; grün – nicht vorhanden: in den letzten fünf Jahren keine Hinweise auf Mückenpopulationen bei Inspektion der Gebiete oder aus Studien; mittelgrau: bei den lokalen Experten liegen keine frischen Daten vor; hellgrau - unbekannt: keine Studien durchgeführt, keine Informationen über Mückenfauna vorhanden (115). (Bilder übernommen aus ECDC 2005 - 2014, mosquito maps)

Außerdem erhöht der steigende Tourismus in die Endemiegebiete das Auftrettsrisiko von DENV-assoziierten Krankheiten in Europa. Zum Beispiel ist im Vereinigten Königreich eine DENV-Infektion, nach Malaria, die zweithäufigste Ursache für den Krankenhausaufenthalt bei Rückkehrern aus Indien (15). Eine Zunahme der importierten Dengue-Fälle wird auch vom Robert-Koch-Institut gemeldet. In den Jahren 2001 bis 2006 wurden 845 Fälle registriert, im Durchschnitt ca. 140 Fälle pro Jahr. In den nachfolgenden vier Jahren stieg die Anzahl der DENV-Infizierten mit ca. 305 pro Jahr auf das Doppelte (21, 24). Bei ca. 3 Millionen Reisenden aus Deutschland in Dengue Endemiegebiete liegt die Inzidenz bei ca. einem Fall pro 10.000 Reisende, dabei ist eine große Dunkelziffer aufgrund von nicht diagnostizierten und nicht gemeldeten Fälle anzunehmen. In Deutschland sind DENV Infektionen seit 2001 meldepflichtig (23).

1.1.1.1 Virusübertragung und Krankheitsverlauf

Bisher wurden vier verschiedene Serotypen von DENV beschrieben: DENV1, DENV2, DENV3 und DENV4. Die Infektion mit einem der Serotypen hinterlässt eine lebenslange serotypenspezifische Immunität. Da in keinem Verbreitungsgebiet nur ein Serotyp endemisch ist, können die Menschen, die in Endemiegebieten leben, mehrmals durch DENV-Infektion betroffen sein (1, 2, 5).

Der Übertragungsweg von DENV ist Mensch – Mücke – Mensch (25). Nach der Aufnahme des infizierten Blutes durch die weibliche Mücke, beträgt die Inkubationszeit des Virus in den Insektenspeicheldrüsen 7-14 Tage (26). Danach kann das Virus weitergegeben werden. Die Mücke bleibt ihr Leben lang infiziert (17). Auch die Larven der infizierten Mücke werden zu Virusüberträgern (25).

Auch über nicht vektorgebundene DENV-Übertragung wird berichtet, wie z.B. durch Nadelstichverletzungen, nach mukokutaner Exposition mit infiziertem Blut, nach Knochenmarkstransplantation, intrapartal sowie einige Fälle von vertikaler Übertragung. Für die vertikale Infektion scheint besonders DENV2 prädominant zu sein. Dies könnte durch hohe Zirkulation dieses Serotyps erklärt werden (27-29). Zu den Hauptkomplikationen bei einer Infektion während der Schwangerschaft zählen vorzeitige Wehen, Frühgeburt, niedriges Geburtsgewicht sowie peripartale mütterliche und kindliche Blutungen (30-32).

1.1.1.2 Dengue Fieber

Es werden drei Verlaufsphasen definiert. In den ersten 4-5 Tagen nach dem Stich einer infizierten Mücke, kommt es zur febrilen Phase mit einem Fieberanstieg bis 40°C und einer Fieberkontinua über 2-3 Tage. Diese ist durch typische Symptome begleitet: starke retroorbitale Kopfschmerzen, Gelenk- und Muskelschmerzen, makulopapulöses Exanthem an den Extremitäten - sogenannte Dengue-Trias (2, 21, 33, 34). Ein Infektionsnachweis ist in dieser Phase alleine durch RT-PCR möglich. Die IgM-Antikörper sind erst ab 6.-10. Tag nach Symptombeginn nachweisbar (21, 35).

Danach folgt die kritische Phase mit Fieberabfall unter 38°C begleitet von Leukopenie, Lymphknotenschwellungen, Thrombozythopenie, Steigerung der Kapillarpermeabilität mit Petechien und Plasmaverlust in den dritten Raum. Diese dauert 24-48 h. Wird sie überlebt kommt es zur „Phase der Rekonvaleszenz“. Die Abheilung ist meistens komplikationslos (2, 34).

1.1.1.3 Hämorrhagisches Denguefieber und Dengue Schock Syndrom

Kommt es in der „kritischen Phase“ zu den hämorrhagischen Phänomenen wie petechiale Blutungen, positiver Tourniquet-Test, Zahnfleischblutungen, inneren Blutungen, Bluterbrechen, Teerstuhl sowie Hepatomegalie, Hämatokritanstieg, Thrombozytenabfall unter 100000/µl und zunehmender Plasmaaustritt in die Körperhöhlen so handelt es sich um das HDF. Vom DSS spricht man wenn die Zeichen eines Kreislaufschocks wie Hypotonie, Tachykardie, Kaltschweißigkeit, Blässe und Unruhe dazukommen (33, 36, 37). Bei einigen Patienten mit DSS kommt es zur disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) (38, 39).

Die meisten DHF-Betroffenen sind Menschen mit der zweiten Dengue-Infektion, die bereits durch einen anderen Serotyp immunisiert wurden (21). Man glaubt, dass heterotypische Infektionen durch heterologe Antikörper eine Steigerung der viralen Aufnahme und Vermehrung in den Fc-Rezeptor tragenden Zellen und somit der Auftrettswahrscheinlichkeit einer DHF bewirken. Dieser Mechanismus wird Antibody Dependent Enhancement (ADE) genannt (40-42).

1.1.1.4 Therapie

Momentan gibt es keine wirksamen Medikamente oder Vakzine, deswegen bleibt die Behandlung des DF, DHF und DSS rein symptomatisch (34). Während der Fieberperiode ist auf ausreichende Flüssigkeitszufuhr zu achten (40). Die antipyretische Therapie ist besonders bei Patienten mit Hyperpyrexie oder bekannten fieberassoziierten Krämpfen empfohlen. Dabei soll auf die Verwendung von Acetylsalicylsäure-Präparate (z.B. Aspirin u.a.) wegen ihrer gerinnungshemmenden Wirkung, Azidosegefahr und möglicher Auslösung des Reye-Syndroms verzichtet werden. Stattdessen wird Paracetamol in einer altersentsprechenden Dosierung empfohlen. Bei agitierten Patienten ist die Gabe von kurzwirksamen nicht lebertoxischen Beruhigungsmitteln vertretbar (39). Bei starkem Plasmaverlust ist eine Volumenersatztherapie mit Gabe von Elektrolytlösungen, Plasmaexpander und/oder humanem Serumalbumin empfohlen. Die Therapie richtet sich nach Hämatokritwert, der engmaschig zu kontrollieren ist. Auch der Säure-Basen-Haushalt soll regelmäßig mittels Blutgasanalyse überwacht und Störungen ausgeglichen werden. Sauerstofftherapie ist bei Schock bei allen Patienten indiziert; Bluttransfusion sowie Gabe von Blutplasma ist bei Patienten mit klinisch signifikanten Blutungen zu erwägen (33, 39, 43). Bei seltenen Krankheitsverläufen, wie zum Beispiel bei akutem Leberversagen, ist das Therapiemanagement schwieriger. Bei Patienten, die einen starken Anstieg von Aminotransferasen und Bewusstseinsveränderungen oder eine pathologische neurologische Symptomatik, wie Hyperreflexie, aufweisen, ist besondere Vorsicht bei intravenöser Flüssigkeitsgabe geboten, um ein mögliches Hirnödem und Enzephalopathie zu vermeiden (39). Der Ausgang von DHF und DSS ist stark vom rechtzeitigen Therapiebeginn und adäquater Symptomkontrolle abhängig.

1.1.2 Morphologie, Genom, Fusions- und Replikationsmechanismus

Dengue Virione sind 40-50 nm große ikosaedrische Partikel, die aus drei verschiedenen Strukturproteinen aufgebaut sind: dem Nukleokapsidprotein C (12-14 kDa), nicht glykosyliertem Membranprotein M (8 kDa) und Glykoprotein E (51-59 kDa), dem wichtigsten Verpackungprotein (17). Das DENV Genom ist

eine einzelsträngige 11-Kilobasen sense-RNA. Sie stellt ein einziges offenes Leseraster (open reading frame = ORF) dar, das für drei Strukturproteine (C, prM, E) und sieben Nicht-Strukturproteine (NS1 (42-50 kDa), NS2A, NS2B, NS3 (69 kDa), NS4A, NS4B, NS5) kodiert (Abb. 4B) (44). Die RNA wird als einzelnes Polyprotein translatiert und durch die Wirts- und die virale Proteasen zurechtgeschnitten. Außerhalb des ORFs befinden sich 5'- und 3'-UTRs (untranslatierte Bereiche). Sie sind an der Translation, Replikation, sowie an dem Viruszusammenbau beteiligt (17). Auf dem 5'-Ende besitzt die RNA ein Typ 1 Cap, ein poly-A-Schwanz am 3'-Ende fehlt (Abb. 4) (45).

Die Infektion durch DENV beginnt mit der Bindung des Proteins-E an den zellulären Rezeptor und der darauf folgenden Penetration in die Wirtszelle mittels Endozytose. Dem Protein-M wird die Rolle eines Chaperons zugesprochen, das für die richtige Faltung des Proteins-E sorgt. Nach der Membranfusion wird die virale RNA frei. Translation und Replikation werden eingeleitet (Abb. 4) (17, 45, 3).

Die Nicht-Strukturproteine sind für die Replikation notwendig (17). Das **NS1**-Glykoprotein ist an der Zelloberfläche von infizierten Zellen zu finden (46) sowie intrazellulär im Bereich des viralen Replikationskomplexes (Abb. 4C) (47). **NS2A**, **NS2B**, **NS4A**, **NS4B** sind hydrophobe membranassoziierte Proteine (17). Die 180-AS-lange N-terminale **NS3**-Domäne bildet mit der 40 AS-langen hydrophilen **NS2B**-Region eine aktive Serinprotease-Einheit (17, 44, 45). Der C-terminale **NS3** Bereich kodiert für RNA-Triphosphatase, RNA-Helikase und NTPase (17, 48). Das **NS5**-Protein besitzt eine Methyltransferase und RNA-abhängige RNA-Polymerase Aktivität (45).

Das Proteins C ist an der Verpackung und Ausschleusung von Virionen aus der Wirtszelle beteiligt (Abb. 4C) (45). Die Partikel werden über den klassischen Sekretionsweg zur Zelloberfläche transportiert (17).

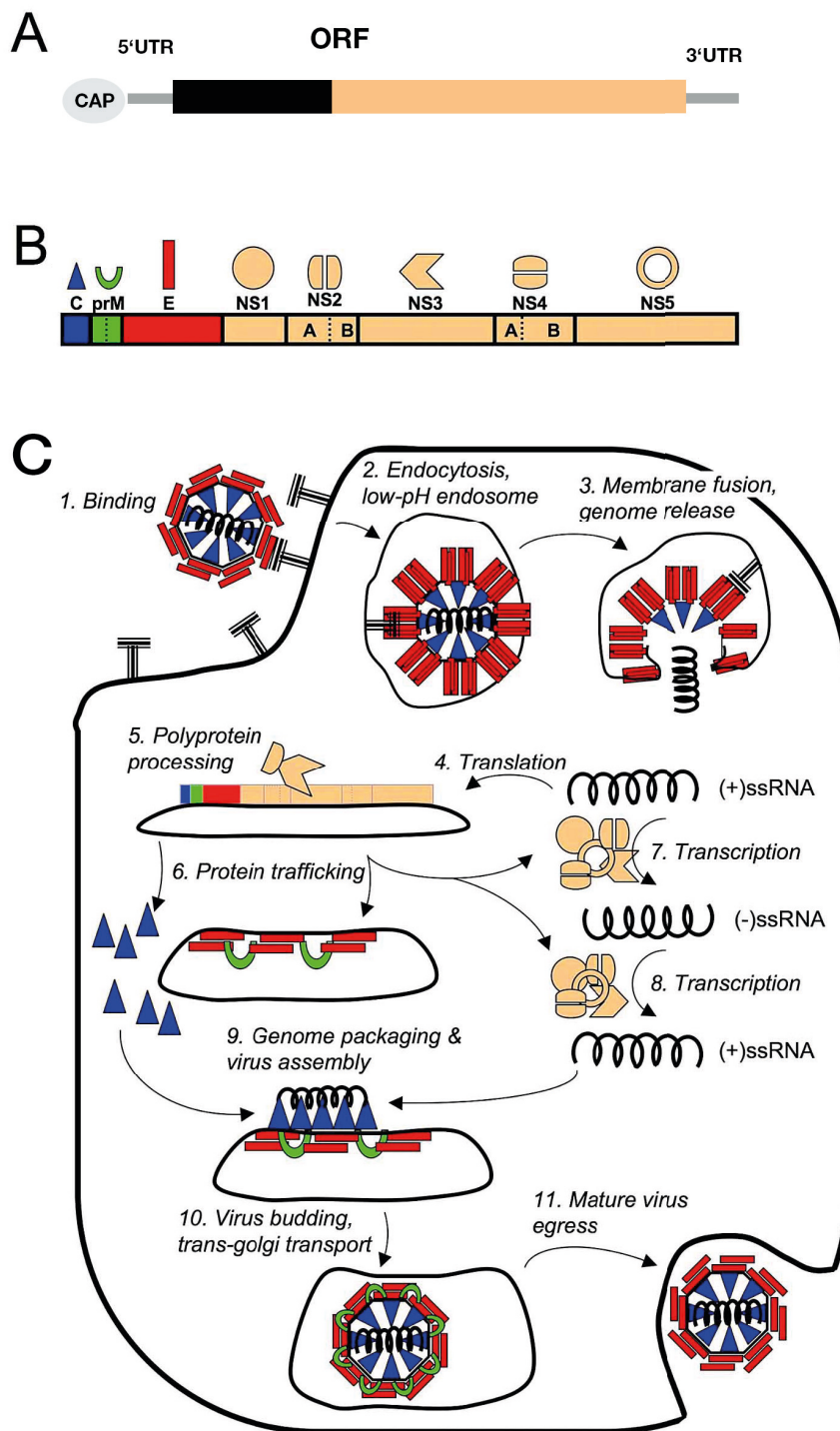


Abbildung 4: A: Aufbau des Dengue Virus RNA Genoms. B: DENV Polyprotein mit Proteinkodierenden Regionen und Schnittstellen der viralen (blaue Pfeile) und der Wirtsproteasen (rote Pfeile). Am Übergang NS1-NS2A spaltet eine noch unbekannt Wirtsprotease im ER. Eine ER-Signal-peptidase schneidet das DENV-Polyprotein in den Bereichen zwischen C-prM, prM-E, E-NS1 und NS4A-NS5. Die Processierung an den NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A und NS4B-NS5 Übergängen geschieht durch die virale NS2B-NS3pro-Serin-Protease (17, 44, 45, 48). C: DENV Vermehrungszyklus. (Bilder übernommen aus FEBS J. 2007, Vol. 274, No.7, p. 2988 und Infectious Disorders - Drug Targets. 2009, Vol 9, No. 3, p. 330)

1.2 Dengue Protease

1.2.1 Struktur und Funktion der NS2B-NS3pro-Protease

Die 180 Aminosäuren lange N-terminale Domäne des NS3-Proteins ist eine Trypsin ähnliche Serinprotease NS3pro mit einer funktionellen katalytischen Triade His 51, Asp 75 und Ser 135 (in DEN-2) (Abb. 5). Dieses Enzym katalysiert die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen. Durch Histidin wird Serin polarisiert und geht eine kovalente Bindung mit der Carbonylgruppe eines Peptids ein, sodass eine tetraedrische Zwischenstufe entsteht. Der Wasserstoff der Serin-Hydroxylgruppe wird durch Histidin übernommen. Die positive Ladung des entstandenen Imidazolium-Ions wird durch eine Wasserstoffbrücke zur Asparat stabilisiert. Durch die Übertragung des Wasserstoffs vom Histidin auf den Stickstoff des Peptids wird die Peptidbindung gespalten und das erste Reaktionsprodukt - R2-NH₂ - entsteht. Zurück bleibt ein Acylenzym-Intermediat. Im nächsten Schritt bildet das im katalytischen Zentrum gebundene Wasser eine Wasserstoffbrücke mit Histidin aus und greift den Carbonyl-Kohlenstoff des Acylenzyms nukleophil an. Dadurch wird die Esterbindung mit Serin gespalten. Das zweite Reaktionsprodukt - R1-COOH entsteht (49).

NS3pro ist zusammen mit NS2B Kofaktor essentiell für die virale Replikation (45, 48, 50). Mutationen in der Protease kodierenden Region können zu ihrer Inaktivität führen und somit die virale Vermehrung unmöglich machen (50).

Das NS2B-Protein wirkt aktivierend auf die NS3pro-Protease und ist somit für ihre optimale katalytische Funktion bei der Prozessierung des Polyproteins zuständig (51). Bei der Erforschung der kristallographischen Struktur von NS3pro und rekombinanten NS2B-NS3pro-Proteins hat man eine NS2B-induzierte Konformationsänderung der Protease gesehen. Im Vergleich zu NS3pro (Abb. 6A) zeigt das rekombinante Protein (Abb. 6B) eine Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur mit räumlicher Umstrukturierung von Aminosäurenresten der katalytischen Triade. Somit erfüllt das NS2B-Protein eine Chaperon-Funktion (17, 44). Der NS2B-NS3pro-Proteasenkomplex schneidet das Polyprotein an den NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A und NS4B/NS5 Übergängen, sowie innerhalb der Protein C, NS2A, NS3 und NS4A Bereiche (Abb. 4) (44, 48).

Einleitung

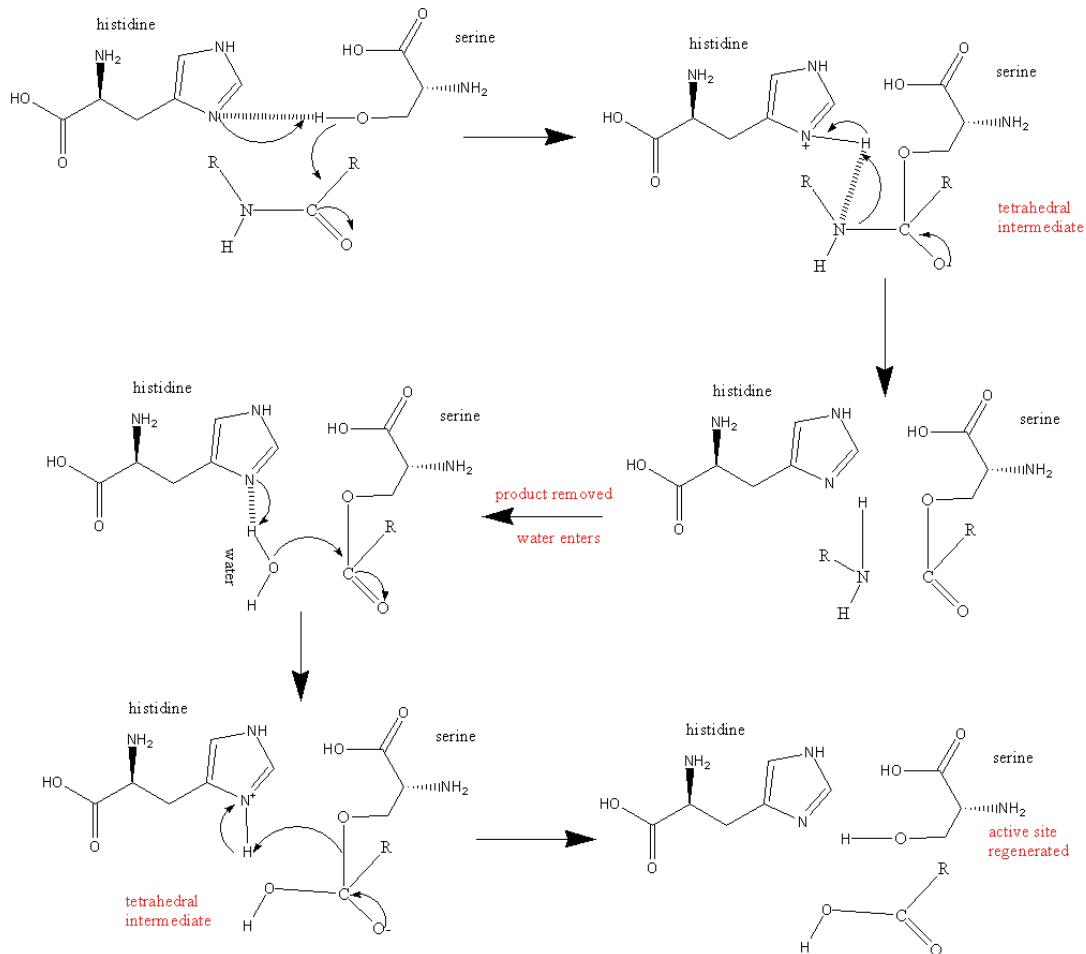


Abbildung 5: Katalysemechanismus einer Serinprotease. Hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen mit Hilfe der katalytischen Triade His 51, Asp 75 und Ser 135. Das Proton von der Serin-Hydroxylgruppe wird durch Histidin übernommen. Das polarisierte Serin bildet eine kovalente Bindung mit der Carbonylgruppe des Peptids. Durch Übertragung des Wasserstoffs vom Histidin auf den Stickstoff des Peptids, wird die Peptidbindung gespalten. Durch Histidin polarisiertes Wassermolekül greift den Carbonyl-Kohlenstoff des Acylenzym-Intermediats nukleophil an und die Bindung mit Serin wird gespalten. (49, 117). (Bild übernommen aus Wikimedia commons 2006)

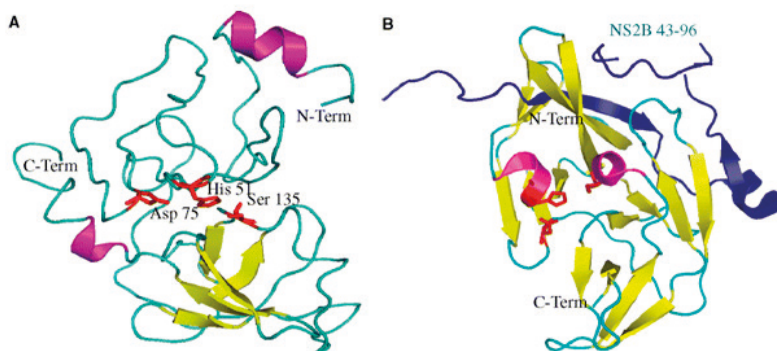


Abbildung 6: Kristallographische Struktur von NS3pro- und von der aktiven Form des NS2B-NS3pro-Proteins. Das 43-96 AS Fragment des Fusionsproteins (NS2B-Glycin Linker-NS3pro) des DENV2 ist in Blau, die katalytische Triade in Rot dargestellt (17). (Bild übernommen aus FEBS J. 2007, Vol. 274, No.7, p. 2993)

1.3 DENV-Protease-Inhibitoren

Die Medikamentenforschung gegen Dengue Infektion geht hauptsächlich in zwei Richtungen. Die eine ist die Entwicklung eines Vakzins, die momentan allerdings ohne Erfolg bleibt (52), während die zweite als Ziel hat die virale Vermehrung zu unterdrücken. Das könnte zum Beispiel mit Hilfe von Proteaseinhibitoren erreicht werden.

Obwohl NS3pro-Proteasen der vier DENV Serotypen nur eine 60 %-ige Strukturähnlichkeit aufweisen, werden von ihnen fast identische Substrate bevorzugt, so dass es durchaus möglich ist, Inhibitoren zu entwickeln, die bei allen Serotypen gleichermaßen wirksam sind (53).

1.3.1 Untersuchung von klassischen Serin-Protease-Inhibitoren

Am Anfang der Inhibitorenforschung gegen NS3pro wurden klassische Serin-Protease-Inhibitoren untersucht. Dabei zeigte sich, dass keiner von diesen, außer Aprotinin, die Protease hemmt. Aprotinin zeigte dagegen eine gute Hemmung in submikromolaren Konzentrationen (3 μ M) (44).

Aprotinin ist ein potenter kompetitiver Inhibitor von Serin Proteasen, wie Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein, Thrombin, aktives Protein C und besitzt somit eine blutstillende und antiinflammatorische Wirkung (54). 1993 wurde es in den USA wegen seiner prothrombotischer Wirkung zur Senkung des perioperativen Blutverlustes in der Bypasschirurgie zugelassen und 2008 wegen Kardiotoxizität wieder vom Markt genommen (55, 56).

Ob Aprotinin in der Behandlung von Patienten mit dem DHF positive Auswirkungen zeigen kann, wurde bis jetzt nicht untersucht.

1.3.2 Untersuchung von Peptid Inhibitoren

Verschiedene Peptid Inhibitoren wurden bereits untersucht. Es konnten wichtige Erkenntnisse über Inhibitor-Enzym-Interaktion gewonnen werden. Es wurde festgestellt, dass Dengue-NS3pro-Protease dibasische Reste in ihren Peptidsubstraten bevorzugt (44, 57). Einige kleinmolekulare Peptidsubstanzen mit guten Hemmeigenschaften wurden dabei identifiziert (Tabelle 2) (57, 58).

	Inhibitoren	K _i (μM)	Substanzklasse	Wirkung
1.	Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H	5,8	Aldehyd	kompetitiv
2.	Bz-Nle-Lys-Arg-(p-Me)Phe-H	6,0	Aldehyd	-
3.	Bz-Nle-Lys-Arg-(p-guanidinyI)Phe-H	2,8	Aldehyd	-
4.	Bz-Lys-Arg-Arg-H	1,5	Aldehyd	-
5.	Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-CF ₃	0,85	Trifluoromethylketon	-
6.	Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-B(OH) ₂	0,043	Borsäure-Tetrapeptid	-

Tabelle 2: Peptidinhibitoren der DENV NS3pro-Protease (57, 58)

Die Peptide zeigten gute inhibitorische Wirkung, soweit sie basische Reste (Arg) an P1 und P2 aufwiesen (Abb.7). Auch Di- und Tripeptide waren unter dieser Bedingung wirksam. Außerdem wurde beobachtet, dass der Ersatz von P1 Arginin durch neutrale, ungeladene aromatische Aminosäurenderivate, wie (p-Me)Phe, nicht zum Verlust der inhibitorischen Wirkung führt, wohl aber der Austausch von P2 Arginin (58).

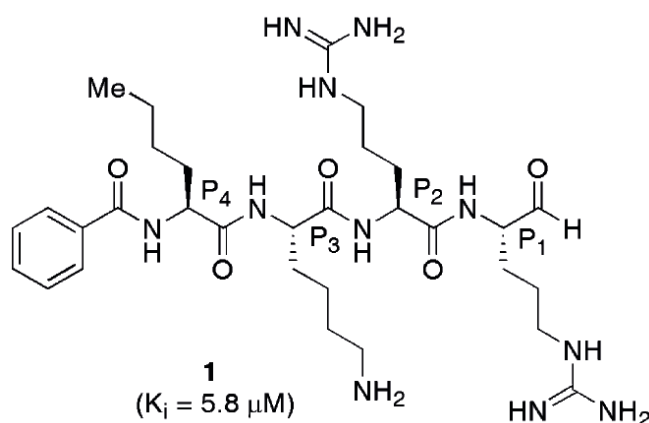


Abbildung 7: Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H (Bild übernommen aus Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Jan. 2006, Vol.16, Iss.1, p.41)

2010 wurde ein kleinmolekularer Inhibitor der DENV NS2B-NS3pro Protease **BP2109** (N,N'-[(9-oxo-9H-fluorene-2,7-diyl)-bis(oxyethane-2,1-diyl)]-bis(N,N-diethyl-decan-1-aminium)) gefunden (IC₅₀ Wert liegt bei 15,43 ± 2,12 μM) (Abb. 8). Seine Hemmung von Expression des DENV2-Replikons liegt bei einem IC₅₀ Wert von 0,17 ± 0,01 μM. Er hemmt DENV (Serotyp 1-4) Replikation und virale RNA-Synthese ohne nachweisbarer Zytotoxizität. Allerdings wurde über einige BP2109-resistente DENV2 Klone berichtet, die Substitutionen R55K und E80K im NS2B-Bereich aufwiesen (59).

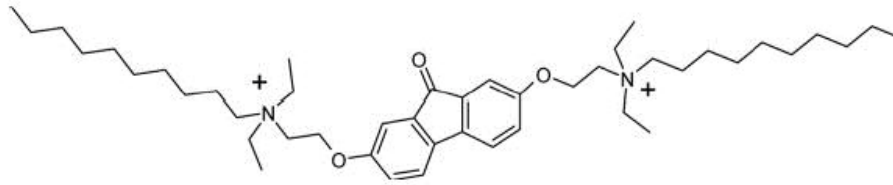


Abbildung 8: BP2109 (Bild übernommen aus Antimicrob Agents Chemother. Jan 2011, Vol. 55, No. 1, p. 232)

1.4. Weitere mögliche ant Flavivirale Medikamente

1.4.1 DENV RNA-Polymerase-Inhibitor NITD008

Im September 2009 wurde über einen Adenosin Nukleosid Inhibitor NITD008 berichtet (60) (Abb.9). Er hemmt vier Serotypen von DENV und weitere Flaviviren wie West-Nile-Virus, Gelbfieber Virus und Tick-borne Enzephalitis Virus. Die Triphosphat Form von NITD008 unterdrückt durch direkte Hemmung der RNA-abhängigen RNA Polymerase die Synthese der viralen RNA und somit die DENV Vermehrung. Es zeigt gute pharmakokinetische Eigenschaften *in vivo* und kann oral zugeführt werden. Bei der Untersuchung in Mäusen wurde eine Suppression der Virämie, Reduktion der Zytokinfreisetzung und eine Verhinderung des letalen Ausgangs beobachtet (60).

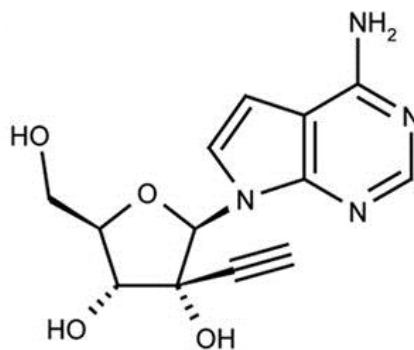


Abbildung 9: NITD008 (Bild übernommen aus Proc Natl Acad Sci U S A. Dec. 2009, Vol. 106, No. 48, p. 20436)

1.4.2 DENV Entry-Inhibitoren

Entry-Inhibitoren werden bereits erfolgreich in der HIV-Therapie eingesetzt. Da auch DENV durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen gelangt, wird viel

in der Entwicklung von Entry-Inhibitoren geforscht. Es wurden mehrere Rezeptoren entdeckt, die in den Eintrittsprozess von DENV involviert sind. Zu den wichtigsten zählt der DC-SIGN-Rezeptor (cell-surface C-type lectin DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) an der Oberfläche von Dendritischen Zellen. Durch die Hemmung von DENV-Rezeptor-Wechselwirkung kann die Immunantwort unterdrückt und somit das Auftreten von ADE-getriggerten (ADE, engl. antibody dependent enhancement) komplizierten Krankheitsverläufen verhindert werden. Weitere Rezeptoren sind Manose Rezeptor (MR) und CLEC5A (C-type lectin domain family 5, member A) an den Makrophagen, Heparinsulfat (HS) und GRP78 an den Hepatozyten und L-SIGN an den Endothelzellen. Vier Entry-Inhibitorklassen wurden bis jetzt beschrieben: Fusioninhibitoren, Glucosidaseinhibitoren, CBAs (Carbohydrate-Binding Agents) und Heparinmimetika (61).

1.4.3 Zyklophiline als möglicher Angriffspunkt für die antinflaviviralen Medikamente

Im März 2009 wurde über Zyklophiline (CyPs) berichtet. Zyklophiline gehören zur zellulären Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIases), die durch Wechselwirkung mit der flaviviralen RNA eine Rolle im viralen Replikationsmechanismus spielen. In Zellkulturversuchen wurde gezeigt, dass Cyclosporine in der Lage sind im nicht toxischen Bereich diese Wechselwirkung zu blockieren und so die virale Replikation zu unterdrücken (62).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Trotz mehrjähriger Forschung gibt es momentan keine Medikamente zur Bekämpfung der DENV-Infektion. In der Therapie von Virusinfektionen (HIV, HCV) gehört die Hemmung der viralen Protease zur den wichtigen therapeutischen Ansätzen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde versucht aus einer Reihe inhibitorisch wirksamen Substanzen solche mit hemmender Wirkung gegen DENV2-Protease herauszufiltern und diese in einer mit Dengue infizierten Zellkultur zu testen.

Als Erstes sollte die DENV2-Protease synthetisiert, aufgereinigt und auf Aktivität überprüft werden. Dazu wurde die DENV2-Proteasekodierende DNA-Sequenz amplifiziert, in einen Vektor mit Polyhistidinregion kloniert und dieser in einer Bakterienkultur vermehrt und geerntet. Anschließend wurden die BL21-star E.coli mit dem Vektor transformiert, vermehrt und die Proteinsynthese induziert. Die Protease wurde mit Hilfe immobilisierter Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt und in einem Enzym-„Assay“ auf Aktivität geprüft. Dazu wurden Aufreinigungsmethoden und Enzym-„Assay“-Bedingungen (Lösungen- und Pufferzusammensetzungen) an die Protease angepasst. Als Nächstes wurden mehrere Hemmstoffe, die bereits bei anderen Proteasen wirksam waren, mit DENV2-Protease in einem fluorometrischen Enzym-„Assay“ getestet. Die beste Verbindung wurde an die Proteasestruktur modelliert und nach den Strukturdaten modifiziert. Derivate wurden synthetisiert und erneut in vitro getestet. Die besten Verbindungen wurden in einer Zellkultur auf Toxizität und ihre Hemmwirkung auf virale Replikation mit Hilfe von Photometrie, Immunhistochemie und Fluorometrie beurteilt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem, Bicton, Biozym, BioLabs, Fermentas, Invitrogen, J.T.Baker, Merck, Qiagen, Roth, Rothenaigner et al. und Sigma bezogen.

2.1.2 Enzyme

Alle Enzyme wurden von Promega bezogen und mit den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffern sowie unter empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

2.1.3 Kits

Champion™ pET Direktional TOPO Expression Kit (Invitrogen), Maxipräp Säulen (Pure Yield™ Clearing Columns, Pure Yield™ Binding Columns) (Promega), pcDNA™ 3.1 Directional TOPO* Expression-Kit (Invitrogen), Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen), Pure Link Purification Kit (Invitrogen), Pure Link Purification Kit (Fermentas), Gene Gel Extraction Kit (Fermentas).

2.1.4 Oligonukleotide

Primer	Sequenz
NS3-s	5` CACCGGAGGAGCTGGAGTATTGTGGGATGTCCCTTC 3`
NS3-a	5` TTACTTTCTTCCAGCTGCAAACCTCCTGAATTC 3`
NS3pro-a	5` TTACTTTTCGAAAAATATCATCTTCGATCTCTGG 3`
NS2B-s	5` CACCATGGCGAGCTGGCCACTAAATGAGGCTATC 3`
NS2B-a (ohne Stoppcodon)	5` CAGTGTTTGTCTTCCCTCTTCGTTTTTTAT 3`

2.1.5 Expressionsvektoren

pET200/D-TOPO Vector (Invitrogen), pET101/D-TOPO Vector (Invitrogen).

2.1.6 Bakterienstämme (transformationskompetent)

E. coli TOP 10 (F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 ga/U ga/K rpsL (StrR) endA1 nupG).

E. coli BL21-star (Invitrogen).

2.1.7 Zelllinien

Vero-Zellen (Affennepthrozyten)

2.1.8 Antiseren

2.1.8.1 Primäre Antikörper

Maus Penta-His-Antybody (Qiagen), Verdünnung 1:1000.

Maus mAb HB46 für DENV2 (Virologie Würzburg), Verdünnung 1:200.

2.1.8.2 Sekundäre Antikörper

UltraTek HRP Anti-Mouse Staining System (Dianova). Anti-Mouse-Cy3 (Dianova).

2.1.9 Größenstandards

2.1.9.1 DNA-Standards

Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

2.1.9.2 Protein-Standards

Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas), Page Ruler Unstained Protein Ladder (Fermentas).

2.1.10 Lösungen, Puffer, Medien

2.1.10.1 Bakterienkultur

5-fach LB-Medium: 100 g LB Broth Base, 25 g NaCl, 5 g α -D-Glucose, ad 1 l dest H₂O. Autoklavierung. Verdünnung mit sterilem H₂O auf 1xLB-Medium.

LB-Agarplatten mit Antibiotikum: 20 g LB Broth Base Lennox, 20 g Agar-Agar, 5 g NaCl, ad 1 l dest. H₂O.

Ampicillin-Stocklösung 100 mg/ml, Kanamycin-Stocklösung 50 mg/ml.

2.1.10.2 Puffer und Lösungen für DNA-Analysen und Klonierungen

2.1.10.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. Coli*

Transformationspuffer I: 10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 50 mM Kaliumacetat (pH 5,8), 15 % Glycerin.

Transformationspuffer II: MOPS 10 mM (pH 7,0), RbCl₂ 10 mM, CaCl₂ 75 mM, 15% Glycerin.

2.1.10.2.2 Plasmidpräparation im kleinen Maßstab (Mini-Präp)

Minipräp-Lösung S1: 50 mM Glukose, 10 mM EDTA (pH 8,0), 25 mM Tris-HCl(pH 8,0).

Minipräp-Lösung S2: 0,2 M NaOH, 1 % SDS.

Minipräp-Lösung S3: 3 M Natriumacetat (pH 5,4).

TE-Puffer: 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA.

TE/RNase-Puffer: 50 μ l TE-Puffer (pH 8,0) + 1 μ l RNase A (10 mg/ml).

2.1.10.2.3 Plasmidpräparation im großen Maßstab (Maxi-Präp)

Maxipräp Resuspension Lösung: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8,0), 100 μ g/ml RNase A.

Maxipräp Cell Lysis Lösung: 0,2 M NaOH, 1 % SDS.

Maxipräp Neutralisation Lösung: 4,09 M Guanidinhydrochlorid (pH 4,8), 759 mM Kaliumacetat, 2,12 M Eisessig.

Maxipräp Endotoxin Removal Wash (Promega): Guanidinhydrochlorid 67 %, 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8,0), 100 μ g/ml RNase A.

dH₂O 33%.

Maxipräp Column Wash: 162,8 mM Kaliumacetat, 22,6 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,109 mM EDTA (pH 8,0).

2.1.10.2.4 Agarosegel-Elektrophorese

0,8 % Agarosegel 50ml: 0,4 g Agarose, 50 ml TAE => 2 min aufkochen, Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid.

TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer (50-fach): 2 M Tris, 50 mM EDTA (pH 8,0), 5,71 % konz. Essigsäure => Verdünnung mit H₂O auf 1xTAE. TAE auch als Laufpuffer.

Ethidiumbromid-Stocklösung 10 mg/ml.

6-fach DNA-Ladepuffer: 0,125 % Bromphenolblau, 40 % Sucrose, dH₂O, autoklavieren.

2.1.10.3 Puffer und Lösungen für Syntheseinduktion, Aufreinigung und Analyse von Proteinen

2.1.10.3.1 Puffer für die denaturierende Proteinaufreinigung

Puffer A (Lysepuffer): 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 6 M GuHCl, mit NaOH auf PH 8.0 titriert.

Puffer B (Lysepuffer): 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea, mit NaOH auf PH 8.0 titriert.

Puffer C (Waschpuffer): 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea, mit HCl auf PH 6,3 titriert.

Puffer D (Elutionspuffer): 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea, mit HCl auf PH 5,9 titriert.

Puffer E (Elutionspuffer): 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea, mit HCl auf PH 4,5 titriert.

2.1.10.3.2 Puffer für die native Proteinaufreinigung

Lysepuffer: 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,5 (Einstellung mit NaOH), 5 % Glycerin.

Waschpuffer: 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5 (Einstel-

lung mit NaOH), 5 % Glycerin.

Elutionspuffer: 50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 100 mM Imidazol, pH 7,5 (Einstellung mit NaOH), 5 % Glycerin.

2.1.10.3.3 SDS-PAGE

SDS-Trenngelpuffer (4-fach): 1,5 M Tris HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS.

SDS-Sammelgelpuffer (4-fach): 0,5 M Tris HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS.

SDS-Laufpuffer (5-fach): 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS.

6-fach SDS-Probenpuffer: 3 ml Glycerin, 1 g SDS, 0,375 mg Bromphenolblau, 3,75 ml β -Mercaptoethanol, add 10 ml.

2.1.10.3.4 Coomassie-Blau-Färbung

Coomassie-Blau: 500 ml Methanol, 400 ml dH_2O , 100 ml Essigsäure, 0,5 g

Coomassie-Blau.

Entfärbungslösung für Coomassie-Blau: 300 ml Methanol, 620 ml dH_2O , 80 ml Essigsäure.

2.1.10.3.5 Western-Blot

Western Blot Transferpuffer: 3,04 g Tris, 14,4 g Glycin, 100 ml Methanol, ad 1 l ddH_2O .

PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4 , 1,5 mM $\text{CaCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$.

Ponceau S Färbelösung: 0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure.

Milchlösung: 5 g Magermilchpulver, 100 ml PBS-Puffer.

ECL Western Blotting Substrate (Promega).

2.1.10.3.6 Dialysepuffer

Dialyse-Puffer 1: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 300 mM NaCl, ad 3 l ddH_2O .

Dialyse-Puffer 2: 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM NaCl, ad 1 l ddH_2O .

2.1.10.3.7 Modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford

Roti®-Nanoquant zur Proteinbestimmung (Roth): 20 ml Roti-Nanoquant (5-fach-konz.), 80 ml ddH₂O.

Eichlösung für Bradford: Rinderserumalbumin 10 mg/ml.

2.1.10.3.8 Puffer für photometrische Analyse der Dengue-NS3pro-Protease

„Assay“-Puffer: 50 mM TRIS-Puffer (pH 8,0), ad 1 l ddH₂O.

Lösungsmittel für Proteaseinhibitoren: DMSO (Dimethylsulfoxid)

2.1.10.3.9 Puffer für fluorometrische Analyse der Dengue-NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease

Puffer für Enzymlösungen: 50 mM TRIS-Puffer (pH 9,0), 10 % Ethylenglykol, 0,0016 % Brij, ad 1 l ddH₂O.

„Assay“-Puffer: 50 mM TRIS-Puffer (pH 9,0), 10 % Ethylenglykol, 0,0016 % Brij, ad 1 l ddH₂O.

Lösungsmittel für Proteaseinhibitoren und Substrat: DMSO (Dimethylsulfoxid)

2.1.10.4 Lösungen für Kultivierung von adhärennten Zellen

MEM (minimal essential medium), 500 ml (Gibco): 10 % FKS (komplementinaktiviert), 5 % L-Glutamin (500 µg/ml), 0,05 % Penicillin (100 µg/ml), 0,05 % Streptomycin (100 µg/ml).

ATV: 8,0 g NaCl, 0,27 g KCl, 1,15 g NaH₂PO₄, 0,2 g K₂PO₄, 0,1 g MgSO₄ x 7 H₂O, 1,125 g Trypsin, Add 1 l dH₂O.

SFM (Serumfreies Medium) (Invitrogen)

2.1.10.5 Lösungen für Zellkulturanalyse

CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega): [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS], phenazine ethosulfate; PES.

Fixierlösung für Zellkulturen: Methanol-Aceton-Gemisch (1:1), Paraformaldehyd 0,4 % (in PBS gelöst).

2.1.11 Inhibitoren

Alle verwendeten Inhibitoren wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schirmeister der Fakultät für Pharmakologie der Universität Würzburg hergestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Amplifikation mit Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (engl. *polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die von K.B.Mullis und M.Smith 1993 entwickelt wurde (116). Spezifische DNA-Sequenzen können exponentiell vermehrt (amplifiziert) werden. Dazu müssen die Randbereiche des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes bekannt sein, um die Primerfunktion erfüllende Oligonukleotide herstellen zu lassen. Die durchschnittliche Primerlänge beträgt 25-30 Nukleotide. Die gesamte Reaktion verläuft in drei Teilschritten, die wiederholt werden können. Im ersten Schritt eines Zyklus - der Denaturierung - wird die DNA bei 90-95°C denaturiert. Im zweiten Schritt - dem Anealing - wird die Temperatur auf 50-60°C gesenkt, sodass die Oligonukleotidprimer an die einzelsträngigen DNA-Matrizen hybridisieren und im letzten Schritt - der Polymerisation (bei 72°C) – der DNA-Polymerase als Startmoleküle dienen (Abb.10).

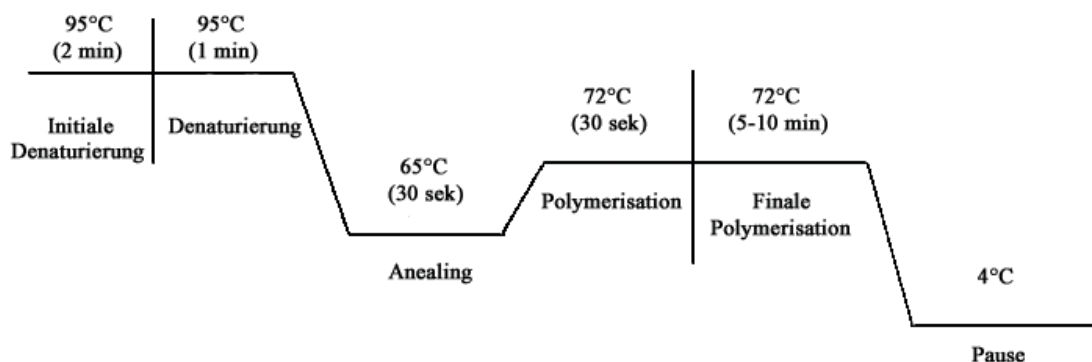


Abbildung 10: Geräteeinstellungen für PCR (Temperaturen und Zeiten bei den jeweiligen PCR-Phasen)

Für den 50 µl Reaktionsvolumen wurden folgende Mengen an Reagenzien verwendet:

10 ng	Matrizen-DNA
0,5 µM	sense Oligonukleotidpreimer
0,5 µM	antisense Oligonukleotidpreimer
1 µl	dNTPs (10 mM)
Herstellerdefinierte Menge	PCR-Puffer
1,25 units	DNA-Polymerase
	ad 50 µl ddH ₂ O

Der gesamte Pipettiervorgang erfolgte auf Eis. Im Anschluss wurde die Inkubation des Reaktionansatzes in einem Thermocycler unter in Abb. 11 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mittels *PureLink™ PCR Purification Kit* aufgereinigt (2.2.1.2).

2.2.1.2 DNA-Aufreinigung mit *PureLink™ PCR Purification Kit*

Zur Aufreinigung der amplifizierten DNA von unvollständigen PCR-Produkten, Oligonukleotiden, Enzymen und Salzen wurde *PureLink™ PCR Purification Kit* von Invitrogen verwendet. Dabei wurde das 4-fache Volumen von *PureLink™ Binding Puffer* (200 µl) zum 1-fachen Volumen von PCR-Produkt (50 µl) zugegeben, gut durchmischt, auf *PureLink™ Spin* Säule gegeben und bei 13000 Upm 1 min lang zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 650 µl *PureLink™ Wash Puffer* gewaschen. Nach Entfernen des Durchflusses wurde bei 13000 Upm 3 min lang erneut zentrifugiert, um die Reste an *Wash Puffer* zu entfernen. Anschließend wurden 50 µl von dem *PureLink™ Elution Puffer* in die Mitte von der Säule gegeben. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das amplifizierte aufgereinigte DNA-Fragment durch 2-minütiges Zentrifugieren eluiert und bei -20°C bis zum Weiterverwenden für Klonierung, Restriktionsverdau oder Sequenzierung gelagert.

2.2.1.3 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-amplifizierte DNA-Sequenzen können in Vektoren kloniert und in Bakterien vermehrt und exprimiert werden. Für Klonierungen und spätere Expression eignen sich z.B. die *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits*, da diese Vektoren einen bakteriellen Promotor haben. Für die Benutzung der Kits braucht man speziell designtes PCR- sense-Primer mit 4-Basensequenz (CACC) am 5`Ende. Das gewünschte DNA-Fragment wird mit diesem amplifiziert und die Ausbeute mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft.

Für den 6 µl Reaktionsvolumen wurden folgende Mengen an Reagenzien verwendet:

0,5-4,0 µl	PCR-Produkt
1,0 µl	TOPO-Salz-Lösung
1,0 µl	TOPO-Vektor
	ad 6 µl ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde gut durchmischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur Transformation in die chemisch kompetente *One Shot® TOP10 E. coli* aufs Eis gestellt.

2.2.1.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Kompetente *E. coli* sind chemisch vorbehandelte Bakterien, die in der Lage sind fremde DNA aufzunehmen. Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 100 ml einfach LB-Lösung mit 1 ml einer TOP10 *E. coli* ÜK angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis eine OD₅₉₅ von 0,2-0,3 erreicht wurde. Die Kultur wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C und 2500 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 20 ml Transformationspuffer I resuspendiert. Nach erneutem zehnmütigem Zentrifugieren 10 min unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 4 ml Transformationspuffer II resuspendiert. Anschließend wurden Bakterien 15 min auf Eis inkubiert, je 100 µl aliquotiert, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die kompetenten TOP10 *E. coli* wurden für Transformation genutzt (siehe 2.2.1.5).

2.2.1.5 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Es wurden 100 µl der bei -80°C aufbewahrten *One Shot® TOP10 E. coli* Suspension auf Eis aufgetaut. 3 µl von dem TOPO® Klonierungsprodukt wurden zu den Bakterien hinzugefügt, vorsichtig durchmischt und auf Eis 30 min inkubiert. Durch den anschließenden Hitzeschock (90 sek bei 42°C) wurde die Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zellen induziert. Danach wurden die Zellen 2 min im Eisbad abgekühlt. 900 µl des antibiotikumsfreien LB-Mediums wurden hinzugegeben und die Bakterien bei 37°C und ständigem Schütteln 1 Std inkubiert. Zwei Selektionsantibiotikum enthaltende Agarplatten wurden 30 min bei Raumtemperatur aufgewärmt. Zellsuspension wurde ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C bebrütet (siehe 2.2.1.6).

Falls eine Proteingewinnung angestrebt wurde, wurden 50 µl von den BL21-star *E. coli* und 2 µl von der Minipräp-DNA (2.2.1.7) bzw. 1 µg der Maxipräp-DNA (2.2.1.8) für den Reaktionsansatz genommen und anschließend nach dem gleichen Prinzip vorgegangen.

2.2.1.6 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Die Anzucht verschiedener *E. coli*-Stämme auf den LB-Agarplatten mit dem benötigten Selektionsantibiotikum erfolgte über Nacht bei 37°C. Für kürzere Zeiträume wurden die Agarplatten mit gezüchteten Kolonien bei 4°C aufbewahrt. Die Kolonien wurden für die Plasmidisolierungen (Minipräparation, Maxipräparation) und Animpfung größerer Flüssigkulturen (z.B. Übernachtskulturen) benutzt. Dabei wurden je nach Methode unterschiedliche Mengen an LB-Medium unter Zuhilfenahme einer sterilen Pipettenspitze mit der einzelnen Bakterienkolonie beimpft und anschließend inkubiert.

Für dauerhafte Konservierung der *E. coli*-Stämme wurden 800 µl einer Übernachtskultur abgenommen, mit 200 µl Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.7 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Minipräparation) wurden die Bakte-

rien alkalisch lysiert. Dabei werden Lipide der Zellmembran und zelluläre Proteine durch SDS gelöst und die Chromosomale- und Plasmid-DNA durch 0,2 M NaOH in die Einzelstränge denaturiert. Die zirkulären DNA-Stränge des Plasmids bleiben jedoch miteinander verknäult. Durch Zugabe von Natriumacetat wird der alkalische pH wieder neutralisiert, wodurch die Plasmid-DNA-Stränge vollständig renaturieren. Die langen chromosomalen Stränge sind dazu nicht in der Lage, es kommt zu teilweise Renaturierung und Bildung eines unlöslichen DNA-Netzwerks. Auch SDS mit gebundenen Lipiden und Proteinen wird durch Natriumacetat gefällt. Am Schluss bleiben Plasmid-DNA, kleine chromosomale Fragmente und RNA in der Lösung übrig. Eine weitere Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch Ethanol-fällung und RNA-Verdau.

Für Mimipräparation von Plasmid-DNA wurden 3 ml von antibiotikahaltigem LB-Medium mit einer einzigen Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft und bei 37°C und ständigem Schütteln über Nacht inkubiert. 1,5 ml der Übernachtskultur (ÜK) wurden abgenommen und in einem Eppendorf Mikrozentrifugenröhrchen bei 13000 Upm (Eppendorf Zentrifuge) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 200 µl S1-Minipräp-Lösung resuspendiert. Für die anschließende Lyse wurden 200 µl der S2-Minipräp-Lösung zugegeben und bei Raumtemperatur 2 min inkubiert. Bei nachfolgender Gabe von 250 µl der S3-Minipräp-Lösung wurde der pH-Wert neutralisiert und die SDS-gebundenen bakteriellen Lipide und Proteine, sowie die denaturierte genomische DNA gefällt. Das Präzipitat wurde 10 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand mit Plasmid-DNA wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von 1 ml -20°C kaltem 100 % Ethanol wurde Plasmid-DNA gefällt. Die ausgefallene DNA wurde 2 min bei 13000 Upm abzentrifugiert, anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen und das Sediment 15 min bei 55°C getrocknet. Danach wurde es in 50 µl TE/RNase bei 55°C 30 min lang gelöst. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde für anschließende Restriktionsanalysen genutzt oder für weitere Experimente bei -20°C eingefroren. Die restlichen 1,5 ml von der Übernachtskultur wurden über einen kurzen Zeitraum bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.8 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Maxipräparation funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die Minipräparation, nur wird hier nach der Neutralisation mit Kaliumacetat-Lösung in Gegenwart von Guanidinhydrochlorid die Plasmid-DNA spezifisch an eine stationäre Silicat-Phase gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Dabei gewonnene größere Mengen an Plasmid-DNA werden zum Beispiel bei der Klonierungen benötigt. Für die Prozedere wurde im Zuge dieser Arbeit das *PureYield™ Plasmid Midiprep* der Firma Promega benutzt.

Bei der Minipräparation gewonnene DNA wurde durch Verdau mit Restriktionsenzymen analysiert. Die Kolonie mit dem gewünschten Plasmid wurde wie folgt weiter vermehrt. Aus der aufbewahrten Übernachtskultur für Minipräparation wurde 1 ml entnommen und ein 200 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum angeimpft. Dieses wurde anschließend bei 37°C 12-16 Std. unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Kultur bei 5000 x g ($g \rightarrow$ Ortsfaktor, 9,8 m/s²), 4°C, 10 min lang zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 6 ml Resuspension-Lösung resuspendiert und mit 6 ml Cell Lysis-Lösung vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei Raumtemperatur wurde das Gemisch mit 10 ml Neutralisation-Lösung unter vorsichtigem Mischen neutralisiert und danach mit 15000 x g bei 24°C 15 min lang zentrifugiert. Dabei wurden die Bakterienreste, wie SDS-gebundene Lipide und Proteine entfernt. Im Anschluss wurde ein Zweisäulen-System aufgebaut. Die erste Säule filtert das Lysat, die zweite Silicat-Säule bindet die Plasmid-DNA. Die erste Säule wurde verworfen, die zweite wurde in zwei Schritten gewaschen: zuerst mit 5 ml *Endotoxin Removal Wash*, um möglicherweise noch vorhandene Endotoxine, Proteine und RNA zu entfernen und danach mit 20 ml *Column Wash*. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 300-500 µl TE-Puffer eluiert. Anschließend wurde spektrophotometrisch die DNA-Konzentration bestimmt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde bis zur Weiterverwendung für Klonierung oder Transformation bei 4°C gelagert.

2.2.1.9 Absorptionsspektrometrische Bestimmung des Nukleinsäuregehalts

Zur Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren in den Lösungen, wird

eine Messung der optischen Dichte (OD) in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels Absorptionsspektrometrie durchgeführt. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 μg dsDNA. Aus dem Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm (spezifische Absorption der aromatischen Basen) und 280 nm (Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren) kann über den Verunreinigungsgrad durch Proteine geurteilt werden. Der Quotient $OD_{260} \text{ nm} / OD_{280} \text{ nm}$ soll im Idealfall im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei Werten unter 1,8 liegt eine Kontamination durch Proteine vor. Durch das Verhältnis von OD_{260} und OD_{230} kann die RNA-Verunreinigung detektiert werden, dabei sollte der Wert idealerweise über 2,0 liegen (63) (64).

Für die Bestimmung des Nukleinsäuregehalts wird 198 μl TE-Puffer mit 2 μl Maxipräp-DNA-Eluat gut vermischt, in eine Quarzküvette gegeben und bei 260 nm gemessen. Die Referenzmessung erfolgte mit 200 μl TE-Puffer.

2.2.1.10 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden zuerst aus den Bakterien isoliert. Es wird angenommen, dass diese bakteriellen Enzyme dem Schutz vor fremder DNA dienen. Das eigene Genom wird durch Methylierung vor Abbau geschützt. Die Erkennungssequenzen dieser Restriktionsenzyme sind Palindrome – DNA-Abschnitte, die eine zweizählige Rotationssymmetrie besitzen. Dabei können die Enzyme ein Palindrom in dessen Mitte oder versetzt dazu schneiden. Dadurch entstehen Fragmente mit glatten oder überhängenden Enden. Die durch Restriktionsverdau gewonnenen DNA-Segmente können für die Klonierungen verwendet werden. Ansonsten wird die Methode zur Analyse von Plasmiden und hergestellten Klonen verwendet. Die verdaute DNA wird auf ein Agarosegel aufgetragen und Restriktionsfragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Aus der Länge der entstandenen Segmente kann auf die Größe des Plasmids, den Erfolg der Klonierung, sowie die Orientierung des eingebauten DNA-Fragments zurückgeschlossen werden. Die Aktivität von Restriktionsenzymen wird in Enzymeinheiten („units“, U) angegeben. Dabei steht 1 U für die Menge an Enzym, die 1 μg Standard DNA pro Stunde umsetzt. Zur Analyse von DNA wurde Restriktionsverdau mit 20 μl Reaktionsvolumen durchgeführt.

0,2-1 µg	Plasmid-DNA
2 µl	10-fach Reaktionspuffer (enzym-spezifisch)
1 U/µg DNA	Restriktionsenzym
	ad 20 µl ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde 1-2 Std. bei der vom Hersteller empfohlener Temperatur inkubiert. Bei Doppelverdau mit zwei Enzymen gleichzeitig, wurde ein Puffer genommen, in dem beide Enzyme eine ausreichend hohe Aktivität besitzen (ab 75 % aufwärts).

Zur Präparation von DNA für weitere Klonierungen wurde Restriktionsverdau mit 100 µl Reaktionsvolumen durchgeführt.

5 µg	Maxipräp-Plasmid-DNA
10 µl	10-fach Reaktionspuffer (enzym-spezifisch)
1 U/µg DNA	Restriktionsenzym
	ad 100 µl ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde 3 Std. bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Ergebnis der Spaltung mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht (siehe 2.2.1.11).

2.2.1.11 Analyse von DNA mit Hilfe von Agarosegel-Elektrophorese

Nach einem Restriktionsverdau oder nach einer PCR können die entstandenen DNA-Fragmente mit Hilfe von Agarosegel-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dabei stehen die Wanderungsstrecke der Nukleinsäuren und der Logarithmus ihrer Größe im linearen Zusammenhang miteinander. Durch das Auftragen eines Markers, der Fragmente bekannter Größe enthält (250-10000 bp), kann das Molekulargewicht unbekannter DNA-Segmente ermittelt werden. Durch Verwendung von Gelen mit höherer Agarose-Konzentration können kleinere Moleküle besser dargestellt werden (Tabelle 3). Um die entstandenen Banden analysieren zu können, werden sie mit Hilfe von Interkalationsfarbstoffen (z.B. Ethidiumbromid) sichtbar gemacht. Diese lagern sich in

die „major groove“ der DNA an und machen diese unter UV-Licht ($\lambda = 925 \text{ nm}$) sichtbar.

Agarosegel (%)	Trennbereich von DNA
0,6	20000-1000 bp
0,8	12000-500 bp
1,0	8000-300 bp
1,2	6000-200 bp
1,5	3500-150 bp
2,0	2000-100 bp

Tabelle 3: Konzentrationsabhängige Trennbereiche der Agarosegele. (Tabelle übernommen aus © 2009 AppliChem • Agarose-Gel-Elektrophorese)

Es wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 % verwendet. Für Herstellung vom Agarosegel wurden je nach gewünschter Gelgröße 0,4 g bzw. 1,2 g Agarosepulver abgewogen und 50 ml bzw. 150 ml TAE-Puffer zugegeben. Durch Erhitzen in einer Mikrowelle wurde Agarose in dem Puffer gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde 3 μl bzw. 7 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugefügt und das Gel in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Durch einen Kunststoffkamm wurden in noch flüssigem Geltaschen erzeugt. Nach dem Auspolymerisieren wird das Gel samt Kamm in eine Laufkammer überführt und diese mit 1-fach-TAE gefüllt. Der Kamm wurde entfernt. In die Geltaschen wurden die zu untersuchenden mit 6-fach-Agarosegel-Probepuffer versetzten DNA-Proben pipettiert. Als Größenmarker wurde der 1-kb-DNA-Marker (Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-120 V. Das fertige Gel wurde unter UV-Licht fotografiert und die Banden analysiert.

2.2.1.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte 100 μl Präparationen oder PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel mit Hilfe von *GeneJET Gel Extraktion Kit* von Fermentas isoliert. Unter einer UV-Licht-Lampe (365nm) wurde die benötigte DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Das gewonnene Gelstückchen wurde in ein abgewogenes leeres 1,5 ml Röhrchen überführt, nochmal gewogen und entsprechend der errechneten Gelmasse 1:1 (Masse:Volumen) mit dem *Binding-Puffer* versetzt. Das Gemisch wurde bei 50-60°C 10 min lang bei

ständigem Schütteln inkubiert, bis das Gel sich vollständig auflöste. Die Lösung wurde auf eine *GeneJET* purification column geladen und 1 min bei 12000 x g zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit 700 µl *Wash-Puffer* gewaschen und noch mal zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Fragment mit 50 µl von *Elution-Puffer* aus der Säule eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.13 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um eine Rezirkularisation und Religation von linearer Träger-DNA, wie der durch Präparation entstandener DNA, zu vermeiden, müssen die Phosphatgruppen von beiden 5'-Enden entfernt werden. Dafür wurde die „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP) von Promega verwendet.

Für den Verdau mit SAP wird der 100 µl Reaktionsansatz wie folgt zusammengesetzt:

1-5 µg	Präparierte-DNA-Lösung
2,0 µl	SAP (500 U)
10,0 µl	Puffer
	ad 100 µl ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde SAP durch Erhitzen auf 65°C (15 min) inaktiviert. Durch diesen Schritt entfällt die sonst notwendige Gelaufreinigung von DNA, sodass eine Ligation gleich im Anschluss möglich ist.

2.2.1.14 Ligation linearer DNA-Fragmente

Für die Ligation notwendige Träger-DNA, in Form eines Maxipräp-Plasmids, und die PCR-amplifizierte „Insert“-DNA wurden mit den gleichen Restriktionsendonukleasen in einem 100 µl Reaktionsansatz verdaut. Die 5'-Enden vom Vektor wurden mit Hilfe von SAP dephosphoryliert.

Die Ligation und die Ligationskontrolle erfolgten als 20 µl Ansatz.

Ligation		Kontrolle	
2 U	T4-DNA-Ligase	2U	T4-DNA-Ligase
2,0 µl	Ligase-Puffer	2,0 µl	Ligase-Puffer
1,0 µl	Vektor-DNA	1,0 µl	Vektor-DNA
8,0 µl	„Insert“-DNA ad 20 µl ddH ₂ O	-keine-	„Insert“-DNA ad 20 µl ddH ₂ O

Ligase-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, pH 7,5.

Beide Reaktionsansätze wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. 10 µl von jedem Ansatz wurden am nächsten Tag für die Transformation kompetenter TOP10 *E. coli* verwendet.

2.2.1.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA nach enzymatischer oder Kettenabbruchmethode ist eine von F. Sanger et al. 1977 beschriebene Methode zur Analyse der Basenabfolge eines DNA-Stranges (118). Die Reaktion verläuft, wie auch die PCR, in drei Teilschritten: Denaturierung, Annealing und Polymerisation (Abb. 11). Im Unterschied zu PCR wird nur ein Primer verwendet, so dass DNA-Strang in eine Richtung verlängert wird. Zusätzlich zu dNTPs werden dem Reaktionsansatz fluoreszenzmarkierte ddNTPs beigefügt. Der Einbau von ddNTP während der Polymerisation führt zum Kettenabbruch. So entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Diese werden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und das Fluoreszenzsignal am Ende jeden Fragmentes detektiert. Die Basenabfolge der Matrizen-DNA wird bestimmt.

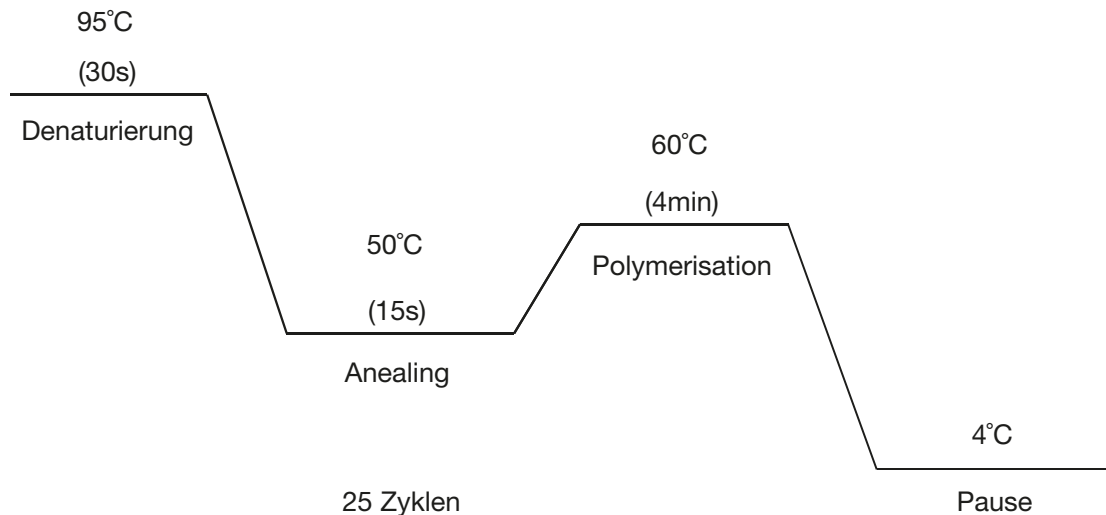


Abbildung 11: Geräteeinstellungen für Sequenzierung (Temperaturen und Zeiten bei den jeweiligen PCR-Phasen)

Zur Analyse der DNA wurde Sequenzierung mit 5 µl Reaktionsvolumen durchgeführt:

1,5 µl	Big Dye (Taq-Polymerase+dNTPs+ddNTPs)
500 ng	DNA
0,33 µl	T7-Primer (forward bzw. reverse)
	Auf 5 µl mit ddH ₂ O auffüllen

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung des proteinsequenztragenden Klons, Vermehrung der klontragenden Bakterien, Induktion der Proteinsynthese

Zur Herstellung von Proteinen wurde die proteinkodierende DNA-Sequenz mittels PCR mit einem speziell designtem Sinn-Oligonukleotid mit 4 –Basensequenz (CACC) am 5`Ende amplifiziert und in ein TOPO-Vektor (pET200/D-TOPO bzw. pET101/D-TOPO) aus dem *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits* von Invitrogen reinkloniert (2.2.1.3). Beide Vektoren hatten eine Polyhistidinregion – His-Tag (6xHis), die bei der Proteinsynthese mittranslatiert wurde.

Das His-Tag hat keinen Einfluss auf die Funktion der hergestellten Proteine, ermöglicht aber ihre Aufreinigung durch Bindung an immobilisierte Metallionen in Chelatkomplexen, wie die von Ni-NTA. Die Methode ist bekannt als IMAC (engl. Immobilized-metal affinity chromatographie) (65).

Es wurden 100µl der *One Shot® TOP10 E. coli* mit 3µl des *TOPO®* Klonierungsprodukts transformiert (2.2.1.5) und auf zwei bei RT aufgewärmten Selektionsantibiotikumhaltigen (Kanamycin bzw. Ampicillin) Agarplatten ausgestrichen (2.2.1.6). Nach einer ÜN-Inkubation bei 37°C wurden 3ml ÜN-Kulturen mit einzelnen Kolonien angeimpft und am nächsten Tag mit Hilfe von Minipröp und Restriktionsverdau analysiert (2.2.1.7, 2.2.1.10). Die positiven Klone wurden selektiert. Ein Maxipröp wurde angesetzt, das gewonnene klonierte Plasmid aufgereinigt und bei 4°C aufbewahrt (2.2.1.8). 50 µl der BL21-star *E. coli* wurden mit 2 µl der Minipröp-DNA (2.2.1.7) transformiert, wiederum auf die antibiotikumhaltigen Agarplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Mit einer einzigen Kolonie wurde anschließend eine 250ml ÜN-Kultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bebrütet. Für Proteingewinnung wurden 2 l 1xLB-Medium angesetzt und mit Selektionsantibiotikum 1:1000 (100 mg/ml Ampicillin-Stocklösung bzw. 50 mg/ml Kanamycin-Stocklösung) versetzt. Je 1 l des Mediums wurde auf zwei 2 l-Erlenmeyerkolben verteilt. 125 ml der ÜN-Kultur wurden in jeden Kolben gegeben und der Ansatz 2 Std. unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurde aus jedem Kolben 1 ml Kultur zur Analyse abgenommen, bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden 0,5 ml 1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) in jeden Kolben pipettiert und der Ansatz weitere 6 Std. bei RT inkubiert. Durch Zugabe von IPTG wurde die Proteinsynthese induziert.

Das IPTG bindet an das Lac-Repressorprotein und verhindert dessen Anlagerung an die DNA. Das Lac-Operon entzieht sich somit der negativen Kontrolle der Repressors und das klonierte Gen kann exprimiert und Proteine hergestellt werden (66).

Auch nach diesem Schritt wurde 1 ml Kultur zur Analyse abgenommen. Die 2 l-Kultur wurde in zuvor abgewogene Behälter überführt und in einer Sorvall-

Zentrifuge mit SLC6000 Rotor bei 4°C und 5000 rpm 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets gewogen und bei -20°C bis zum nächsten Tag eingefroren.

2.2.2.2 Denaturierende Proteinaufreinigung

Die eingefrorenen Bakterienpellets wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 ml Puffer B pro 1 g Pellet versetzt, in ein 50 ml Röhrchen überführt und auf einem Rührrad bei RT 30 min inkubiert. Die Lösung wurde anschließend bei 4°C 14000 x g in einer Zentrifuge mit SS-34 Rotor 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml-Röhrchen überführt, das Pellet wurde verworfen. Zu je 30 ml Überstand wurden 0,5 ml Ni-NTA-Agarose-„Beads“ zugegeben und weitere 30 min auf dem Rührrad inkubiert. (Dabei bildet das Fusionsprotein mit den Imidazolringen seines Poly-His-Taqs einen Chelatkomplex mit den Ni²⁺-Ionen der Agarose-„Beads“ und bleibt an diese gebunden.) Nach erneutem 5-minütigem Zentrifugieren bei 4°C und 1500 rpm wurden Ni-NTA-Agarose-Matrix vom Überstand getrennt, der Überstand wurde bei -80°C, bis zum Nachweis einer erfolgreichen Aufreinigung, eingefroren und die Ni-NTA-Agarose-Matrix im Puffer C drei Mal gewaschen. Dabei wurden 10 ml des Puffers zugegeben, die Suspension kurz geschüttelt und bei 4°C und 1500 rpm 5 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang noch zwei weitere Male wiederholt. Anschließend wurde das Protein eluiert. 0,5 ml des Puffers D wurden zu den „Beads“ gegeben, gut vermischt und der Puffer samt „Beads“ in ein neues 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach einem kurzen 2-3 sekündigem Zentrifugieren bei ansteigender Drehzahl (13000 rpm) und anschließender Drehzahlreduktion bis zum Stillstand wurde der Überstand in ein neues beschriftetes Röhrchen (z.B. D1) aufgenommen und auf Eis gestellt. Der Vorgang wurde mit dem Puffer D noch zwei Mal und dann mit Puffer E dreimal wiederholt. Von den Protein-Eluaten D1, D2, D3, E1, E2, E3 sowie übrig gebliebenen Ni-NTA-Agarose-Matrix wurden 50 µl abgenommen und für Analysezwecke bei -20°C eingefroren. Die Eluate selbst wurden bis zum Weiterverwenden bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Native Proteinaufreinigung

Die benötigten Puffer (Lysepuffer, Waschpuffer, Elutionspuffer) wurden wie oben beschrieben zusammengesetzt. Nach dem Einstellen des pH-Wertes wurde 5 % Glycerin hinzugegeben. Die eingefrorenen Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 ml Lysepuffer pro 1 g Pellet versetzt, gut durchmischt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die resuspendierten Bakterien wurden 30 sec sonifiziert. Das Lysat wurde anschließend bei 4°C 27000 x g in einer Zentrifuge mit SS-34 Rotor 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml-Röhrchen überführt, das Pellet wurde verworfen. 2 ml von den Ni-NTA-Agarose-„Beads“ wurden mit 60 ml Lysepuffer 30 min lang gewaschen und danach 5 min bei 4°C und 1500 rpm abzentrifugiert. Das Zelllysate wurde zu der Ni-NTA-Agarose-Matrix hinzugegeben und die Suspension weitere 30 min bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Nach einem weiteren fünfminütigen Zentrifugieren bei 4°C und 1500 rpm wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die „Beads“ mit 30 ml Waschpuffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugieren wurde der Waschpuffer entfernt und das Protein in 6 Waschungen mit je 1ml Elutionspuffer, nach dem gleichen Prinzip, wie in der denaturierenden Proteinaufreinigung, von der Matrix eluiert. Hier wurden die Ni²⁺-Ionen durch Konkurrenz mit Imidazol, das in hoher Konzentration im Elutionspuffer enthalten ist, aus dem Chelatkomplex mit Poly-His-Fusionsprotein herausgewaschen. Von den Protein-Eluaten E1-E6 sowie übrig gebliebenen Agarose-„Beads“ wurden 50 µl abgenommen und für Analysezwecke bei -20°C eingefroren. Die Eluate selbst wurden bis zum Weiterverwenden bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.4 Analyse der Proteine in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen

Ein SDS-Polyacrylamidgel besteht aus zwei Phasen: dem Sammelgel und dem Trenngel. Die Proteine werden im weitmaschigen Sammelgel zuerst konzentriert und dann im engmaschigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch einen unterschiedlichen Acrylamidgehalt des Trenngels kann der Trennbereich der Proteingröße entsprechend angepasst werden (Tabelle 4).

Acrylamidkonzentration (%)	Trennbereich (kDa)
6	50-200
8	30-95
10	20-80
12	12-60
15	10-43

Tabelle 4: Acrylamidkonzentrationabhängige Trennbereiche der Polyacrylamidgele (Tabelle übernommen aus Gebrauchsanweisung Rotiphorese®-Fertiggellösungen 2005)

Zusammensetzung der Gele:

Trenngel	8 %	10 %	12,5 %	15 %	
SDS-Trenngelpuffer (4x)	3,75	3,75	3,75	3,75	[ml]
30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1)	3,0	3,75	4,68	5,6	[ml]
ddH ₂ O	8,25	7,5	6,57	5,65	[ml]
10 % APS	150	150	150	150	[µl]
TEMED	25	25	25	25	[µl]

Sammelgel	3 %	
SDS-Sammelgelpuffer (4x)	1,25	[ml]
30 % Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1)	0,65	[ml]
ddH ₂ O	3,0	[ml]
10 % APS	100	[µl]
TEMED	10	[µl]

Zur Analyse der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel wurden zwei Glasplatten mit „Spacer“ versetzt und auf der SDS-Gel-Gießapparatur befestigt. Das Trenngel wurde angesetzt und zwischen den Platten gegossen. Auf das noch flüssige Gel wurden ca. 300 µl Isopropanol pipettiert. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde der Isopropanol mit ddH₂O ausgespült und das Restwasser mit Saugpapier entfernt. Das Sammelgel wurde zusammengesetzt und auf das Trenngel gegossen. Mit Hilfe eines Kunststoffkamms wurden Taschen erzeugt. Das fertige Gel samt Glasplatten wurde auf der Elektrophoreseapparatur befestigt, diese wurde mit SDS Laufpuffer gefüllt, der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit Page Ruler Prestained Proteinmarker und Protein-

proben gefüllt. Die Proteinproben wurden zuvor mit SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95°C 5 min gekocht. Die Auftrennung erfolgte bei 80-120 V.

2.2.2.5 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Coomassie-Blau-Farbstoff reagiert mit basischen Aminosäuren in Proteinen und erlaubt das Anfärben im Acrylamidgel. Nach der Auftrennung von Proteinen mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (2.2.2.4) wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, in die Coomassie-Blau-Lösung eingelegt und für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gel in der Entfärbelösung ÜN bei 4°C fixiert und am nächsten Tag ausgewertet.

2.2.2.6 Western-Blot-Analyse von Proteinen

Für eine Western-Blot-Analyse wurden die im SDS-PAGE (2.2.2.4) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das SDS-Polyacrylamidgel kurz im Western-Blot-Puffer inkubiert, eine Nitrozellulosemembran und 6 Whatman-Papier-Stückchen in der Gelgröße (8x10 cm) wurden vorbereitet, im gleichen Puffer getränkt und in der folgenden Reihenfolge auf der Blot-Apparatur platziert (Abb.12).

Bei einem Gel der Größe 8x10 cm erfolgte der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran bei 20 V und 0,4 A über 30 min. Für zwei Gele dieser Größe wurde die Stromstärke verdoppelt. Nach dem Blot-Vorgang wurde die Membran eine Minute lang in der Ponceau S-Lösung gefärbt und anschließend mit vollentsalztem Wasser abgewaschen. Wenn die Proteinbanden sichtbar wurden, war der Transfer erfolgreich. Die Membran wurde eine Stunde in 5 % Milchpulver in PBS bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine ÜN-Inkubation mit dem in der Milchlösung 1:1000 gelösten Erstantikörper bei 4°C und unter ständigem Schütteln. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal über 5 min mit PBS gewaschen, mit dem in PBS gelösten Zweitantikörper 2 Stunden lang bei RT auf dem Schüttler inkubiert, erneut mit PBS gewaschen und anschließend zwischen zwei Whatman-Papierstücken getrocknet. Für die Entwicklung wurden jeweils 1 ml der ECL Western Blotting Substrate 1 und 2 gemischt. Die Membran wurde auf eine Klarsichtfolie gelegt und das

Gemisch gleichmäßig über diese verteilt. Nach einer Minute Einwirkzeit wurde die Lösung entfernt, die Membran erneut getrocknet und mit der zweiten Folie bedeckt. Die anschließende Exposition von Röntgenfilmen erfolgte Intensitätsabhängig zwischen 30 sec und 30 min. Nach der Entwicklung konnten diese anhand des farbigen Proteinmarkers auf der Nitrozellulosemembran ausgewertet werden.



Abbildung 12: Schema des Western-Blot-Aufbau. Auf die Kathode-Platte werden drei puffergetränkte Whatmann-Papier-Stückchen gelegt, darauf das inkubierte SDS-Polyacrylamidgel, oberhalb das Nitrozellulosemembran und anschließend wieder drei Whatmann-Papier-Stückchen. Nach dem Entfernen von Luftblasen wird die Anode-Platte drauf gesetzt. Unter Stromeinwirkung werden die aufgetrennten Proteinbanden auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

2.2.2.7 Dialyse von Proteinlösungen

Nach einer denaturierenden Proteinaufreinigung, wie in Kap. 2.2.2.2 beschrieben, erfolgte eine Vierstufendialyse. Dabei wurde die Eluate in einen Dialyseschlauch (MWCO 8,000, Diameter 7,5 mm; von Spektrum) überführt und drei Mal gegen 1 l des Dialysepuffers 1, sowie einmal gegen 1 l des Dialysepuffers 2 bei 4°C über jeweils 4 Std. dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend bei 10000 x g 10 min lang zentrifugiert. Die Proteinkonzentration der Lösung wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Die Probe wurde aliquotiert, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.8 Bestimmung des Proteingehalts (modifizierte Proteinbestimmung nach Bradford)

Der Farbstoff Coomassie-Blau reagiert mit Proteinen und wird dabei aus dem kationischen Zustand mit dem Absorptionsmaximum bei 470 nm in den anionischen mit dem Absorptionsmaximum bei 595 nm überführt. Durch Absorptionmessung bei dieser Wellenlänge unter Zuhilfenahme einer Eichproteinlösung konnten die Proteinkonzentrationen bestimmt werden.

Zur Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe einer Eichlösung mit bekannter Konzentration (z.B. Rinderserumalbumin) angesetzt:

Verdünnungsreihe Proben-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Konzentration des Rinderserumalbumins in den Proben [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078

Roti-Nanoquant-Lösung (5-fach-konz.) wurde 1:5 mit ddH₂O verdünnt und je 1 ml in Küvetten pipettiert. 5 μl jeder Proteinlösung aus der Verdünnungsreihe sowie der Probe mit unbekannter Konzentration wurden dazugegeben, gut vermischt und 2 min lang inkubiert. Die Absorptionmessung erfolgte bei 595 nm. Die gemessenen Extinktionswerte der Verdünnungsreihe wurden zu einer Eichgerade zusammengefasst. Die Konzentration der unbekanntenen Proteinlösung wurde anhand dieser abgeschätzt.

2.2.3 Zellbiologische, virologische, enzymkinetische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die adhärenenten Zellen, im hier beschriebenen Fall Vero-Zellen, wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Luftgehalt im MEM-Medium als 10 ml-Kultur gezüchtet. Zweimal pro Woche wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde das alte MEM-Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und verworfen. Die Mediumreste wurden durch einmalige Waschung mit ATV entfernt und die Zel-

len bis zur Ablösung in 2 ml ATV bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 8 ml frisches MEM-Medium zugegeben und die Zellen gründlich resuspendiert. 1ml von der Zellsuspension wurde in der Kulturflasche gelassen und mit 9 ml Medium verdünnt, die restlichen Zellen wurden nach der Bestimmung der Zellmenge pro μl für die Animpfung von Zellkulturplatten (6-Napfplatte, 48-Napfplatte und 96-Napfplatte) benutzt.

2.2.3.2 Zelldichtebestimmung und Animpfung von Zellkulturplatten

Die Zelldichtemessung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, dabei wurde die Zellzahl pro 1 ml bestimmt. Die Zellen wurden anschließend bis zur notwendigen Zellzahl/ml verdünnt und auf den Zellkulturplatten ausgesät.

Zellkulturplatten:	Zellmenge pro ml	ml pro Napf
96- Napfplatte	1×10^4	100 μl

Bei der Zellkultivierung über mehr als 4 Tage, wurde die Zellmenge/ml entsprechend angepasst. Da das Dengue-Virus für seine Vermehrung in einer Zellkultur ca. 7 Tage braucht, wurden die Zellkonzentrationen wie folgend verändert:

Zellkulturplatten:	Zellmenge pro ml	ml pro Napf
96- Napfplatte	1×10^3	100 μl

Die Kultivierung erfolgte bei gleichen Bedingungen, wie bereits in Kap. 2.2.3.1 beschrieben. Die Zellkulturen wurden für die Toxizitätsmessungen von Proteaseinhibitoren, sowie für Infektiositätsmessungen benutzt.

2.2.3.3 Vermehrung von DENV2 in Vero-Zellen

Die Vermehrung von DENV2 in Vero-Zellen erfolgte unter S3-Bedingungen (Sicherheitslabor Schutzstufe 3 nach der Biostoffverordnung). Zwei 10 ml Vero-Zellen-Kulturen (1×10^3 Zellen/ml) wurden vorbereitet. 2 ml der eingefrorenen Virus-Medium-Suspension wurden aufgetaut und auf die Zellen der einen

Kulturflasche gegeben. Die zweite Zellkultur wurde als Kontrolle uniniziert gelassen. Nach 7 Tagen wurden die beiden Flaschen miteinander verglichen. Die infizierten Zellen hatten sich vollständig von der Oberfläche abgelöst, die nicht infizierten hatten sich Regel gerecht vermehrt. Die Zell-Virus-Suspension aus der infizierten Kulturflasche wurde abgesaugt und bei 1500 rpm und 4°C 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. 5 ml davon wurden für die Infektion der nächsten 10 ml Vero-Zellen-Kultur verwendet und der Rest bei -80°C eingefroren. Die Erhöhung der Virusmenge wurde durch mehrmaliges Wiederholen des oben beschriebenen Vorgangs erreicht. Nach dem fünften Zyklus war die Virusmenge hoch genug für die Inhibitorenanalyse.

2.2.3.4 Fixierung von Zellen

Die Fixierung von Zellen erfolgte entweder mit Hilfe von Methanol-Aceton oder mit Paraformaldehyd (PFA 4 %, im PBS gelöst). Dabei wurde -20°C kaltes Methanol-Aceton-Gemisch bzw. PFA für 5 min auf die Zellen gegeben und anschließend mit PBS dreimal ausgewaschen. Die fixierten Zellen wurden bei 4°C bis max. eine Woche in PBS gelagert.

2.2.3.5 Methoden zur Analyse von Proteaseinhibitoren *in vivo*

2.2.3.5.1 Bestimmung der Zytotoxizität von DENV2-Proteaseinhibitoren

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden 96-Napfplatten mit Vero-Zellen (1×10^4 /ml) angeimpft. Die Inhibitoren wurden so mit DMSO verdünnt, dass die Endkonzentrationen in einem 100 µl Ansatz jeweils 80, 20, 5, 1,25 und 0,5 µM betragen haben. Für eine zusätzliche Messung wurden in DMSO gelöste Inhibitoren noch im Verhältnis 1:5 mit Medium verdünnt, die Endkonzentrationen im Ansatz blieben die gleichen. Die Verdünnung diente dazu die zytotoxische Wirkung von DMSO zu reduzieren. In jedes Nöpfchen wurde jeweils 1 µl des Inhibitors gegeben. Jede Konzentration wurde dreifach pipettiert. Die Zellen wurden zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des *CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assays* in jedes Nöpfchen gegeben.

Nach einer und nach zwei Stunden Inkubationszeit wurde Absorption bei 490 nm gemessen. Als Referenzwert diente der Messwert mit DMSO statt Inhibitor bzw. 1:5 DMSO:Medium. Der Referenzwert wurde den 100 % der Absorption gleichgesetzt und die restlichen Messergebnisse entsprechend in Prozent umgerechnet und in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

2.2.3.5.2 Beurteilung der Wirkung von DENV2-Proteaseinhibitoren mit Hilfe von Immunhistochemie und Fluorometrie

2.2.3.5.2.1 Visuelle Beurteilung

Für die visuelle Beurteilung der Wirkung von Proteaseinhibitoren *in vivo* wurden durchsichtige 96-Napfplatten mit Vero-Zellen (1×10^4 /ml) angeimpft und ÜN bei o.g. Bedingungen bebrütet. Die Wirkung von Proteaseinhibitoren wurde bei Konzentrationen von 20, 5 und 2,5 μ M analysiert. Die beschriebenen Konzentrationen waren die Endkonzentrationen in einer 100 μ l Zellkultur. Dafür wurden die Inhibitoren zuerst auf die Konzentrationen von 4, 1 und 0,5 mM mit DMSO und dann 1:1 mit MEM-Medium auf 2, 0,5 und 0,25 mM weiterverdünnt. Durch Verdünnung mit Medium wurde das zytotoxische DMSO reduziert. Bevor der Inhibitor hinzugegeben wurde, wurden aus jedem Nöpfchen 10 μ l Medium abgenommen, damit bei nachfolgender Zugabe von 10 μ l Virussuspension (2.2.3.3) das Endvolumen weiterhin 100 μ l beträgt. In jedes Nöpfchen wurde anschließend 1 μ l des Inhibitors gegeben, dabei wurde jede Konzentration doppelt pipettiert. Die Zellen wurden 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im S3-Labor erfolgte dann die Zugabe von 10 μ l Virussuspension aus der reifen Zell-Virus-Kultur. Die Zellen wurden über drei Tage weiterinkubiert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit Paraformaldehyd wie oben beschrieben fixiert und für die Analyse mit dem Fluoreszenzmikroskop gefärbt. Dafür wurde das PBS von den fixierten Zellen entfernt und 50 μ l von der 0,2 % Triton-Lösung in jedes Nöpfchen pipettiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS, jeweils 5min lang, gewaschen. Der DENV2 Antikörper wurde mit PBS 1:200 verdünnt und auf die Zellen gegeben, jeweils 30 μ l pro Nöpfchen. Die Zellen wurden entweder ÜN bei 4°C oder 2 Std. bei RT inkubiert. Der

Näpfchen wurden dreimal in PBS gewaschen und der 1:200 verdünnter fluoreszenzfarbstoffgekoppelter Zweitantikörper – Anti-Maus-Cy2/-Cy3 auf die Zellen pipettiert (30 µl pro Näpfchen). Die Zellen wurden eine Stunde bei RT im Dunklen inkubiert. Nach erneutem dreifachem Waschen, wurden 100 µl PBS auf die Zellen gegeben und diese im Fluoreszenzmikroskop angeschaut. Die Emissionswellenlänge für den Zweitantikörper lag bei 570 nm bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm. Die Inhibitoren mit der besten Hemmung wurden ausgewählt und ihre Wirkung durch Fluoreszenzmessung quantitativ beurteilt.

2.2.3.5.2.2 Fluoreszenzmessung

Für die quantitative Fluoreszenzmessung wurden schwarze 96-Napfplatten mit Vero-Zellen (1×10^4 /ml) angeimpft und ÜN bei o.g. Bedingungen bebrütet.

Die Wirkung von Proteaseinhibitoren wurde bei 2,5, 1, 0,5, 0,1 und 0,05 µM analysiert. Die beschriebenen Konzentrationen waren die Endkonzentrationen in einer 100 µl Zellkultur. Dafür wurden die Inhibitoren zuerst auf die Konzentrationen von 500, 200, 100, 20 und 10 µM mit DMSO und dann 1:1 mit MEM-Medium auf 250, 100, 50, 10 und 5 µM weiter verdünnt. Bevor der Inhibitor hinzugegeben wurde, wurden aus jedem Näpfchen 10 µl Medium abgenommen, damit bei nachfolgender Zugabe von 10 µl Virussuspension das Endvolumen weiterhin 100 µl betrug. In jedes Näpfchen wurde anschließend 1 µl des Inhibitors gegeben, dabei wurde jede Konzentration doppelt pipettiert. Die Zellen wurden 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Im S3-Labor erfolgte dann die Zugabe von 10 µl Virussuspension (Kap. 2.2.3.3). Anschließend wurden die Zellen über drei weitere Tage inkubiert. Das weitere Vorgehen - Fixierung, Färbung - ist gleich wie bei der visuellen Beurteilung. Die fluorometrische Messung erfolgte mit einem SAFIRE II Gerät.

Einstellungen am Fluorometer:

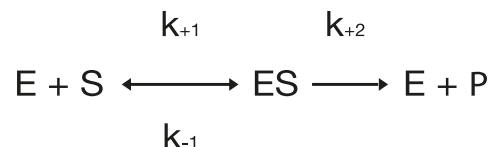
Messverfahren	Fluorescence Top
Anregungswellenlänge	550 nm
Detektionswellenlänge	570 nm
Ex. Bandbreite	9 nm
Em. Bandbreite	9 nm

Gain (Optimal)	185
Anzahl der Messungen	2
FlashMode	High sensitivity
Integrationszeit	40 μ s
Verzögerungszeit	0 μ s
Messungen pro Näpfchen	2x2
Zeit zwischen den Messungen	2 ms
Temperatur:	25°C

2.2.3.6 Methoden zur Analyse von Proteaseinhibitoren *in vitro*

2.2.3.6.1 Grundlagen der Enzymkinetik

Als Grundlage der Enzymkinetik dient das Michaelis-Menten-Modell. Dieses beschreibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion von der Substratkonzentration [S]. Der Zwischenprodukt der Reaktion ist der Enzym-Substrat-Komplex [ES]. Seine Umwandlung in das Enzym [E] und den Produkt [P] stellt den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der katalytischen Reaktion dar. k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} sind die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion (67, 68).



Die maximale Katalysegeschwindigkeit (V_{max}) wird erreicht, wenn alle Enzymmolekule in Form von Enzym-Substrat-Komplexen vorliegen, wie es bei einem Substratüberschuss der Fall ist (67).

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m gibt diejenige Substratkonzentration an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit (V) nur die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit beträgt (Abbildung 13). Außerdem beschreibt sie die Affinität des Enzyms zum Substrat im Enzym-Substrat-Komplex, wenn $k_{+2} \ll k_{-1}$ ist. Je niedriger der K_m -Wert, desto stärker ist die Bindung (68). Unter Berücksichtigung der Voraussetzungen für dieses enzymkinetische Model wurde von Michaelis und Menten folgende Gleichung für die Reaktionsgeschwindigkeit hergeleitet.

Michaelis-Menten-Gleichung:
$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Formt man die Michaelis-Menten-Gleichung reziprok um, ergibt sich eine Geradengleichung ($y=a \cdot x+b$), dabei ist $1/V$ die Funktion von $1/[S]$. K_m/V_{\max} entspricht der Steigung a und $1/V_{\max}$ dem Schnittpunkt mit der Ordinate (Abbildung 14).

Linearisierte Michaelis-Menten-Gleichung:
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Die doppelt-reziproke Auftragung der Michaelis-Gleichung ist als Lineweaver-Burk-Diagramm bekannt (Abbildung 15, 16). Mit ihrer Hilfe können K_m und V_{\max} aus den in einem Enzym-„Assay“ gemessenen Werten bestimmt werden.

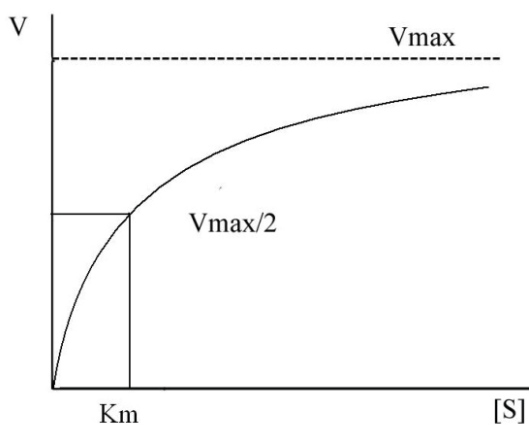


Abbildung 13: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration

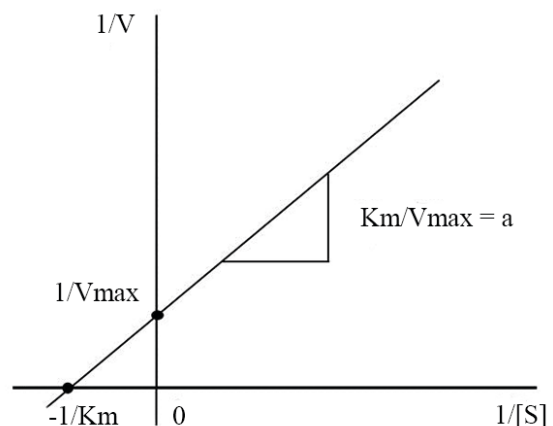


Abbildung 14: Auftragung nach Lineweaver-Burk

Einfluss von Inhibitoren auf Enzymaktivität.

Kompetitive Hemmung. Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert der Inhibitor $[I]$ mit dem Substrat $[S]$ um die Enzymbindungsstelle, so dass ein Teil des Enzyms $[E]$ als EI -Komplex vorliegt und deswegen nicht mehr zur Produktbildung beiträgt. Somit wird die Katalysegeschwindigkeit vermindert. Durch Erhöhung der Substratkonzentration, kann der Inhibitor aus dem katalytischen Zentrum entfernt werden und die Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ihr Maximum.

Die V_{max} bleibt also bei dieser Art der Hemmung konstant. K_m -Wert wird dagegen größer, da man größere Substratkonzentrationen für das Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit braucht. Dies ist auch in der Lineweaver-Burk-Auftragung in Abb. 15 zu sehen (68, 70).

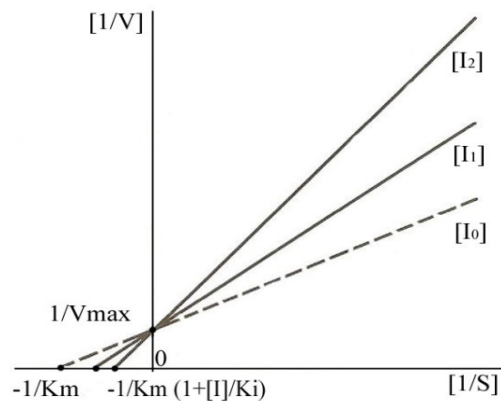


Abbildung 15: Lineweaver-Burk-Auftragung bei kompetitiver Hemmung

Nichtkompetitive Hemmung. Bei der nichtkompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor nicht am aktiven Zentrum, sondern an einer anderen Stelle des Enzyms und führt zur seiner Konformationsänderung, welche auch das aktive Zentrum betrifft. So kann der Substrat schlechter bzw. gar nicht an das Enzym binden und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nimmt ab. Die Inhibitorwirkung kann in diesem Fall nicht durch Substratüberschuss aufgehoben werden. Der K_m -Wert bleibt also gleich (68, 70), siehe Abbildung 16.

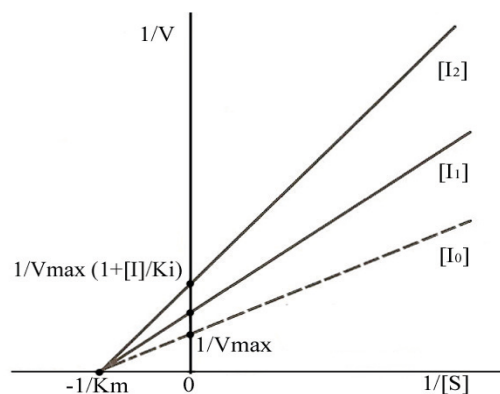


Abbildung 16: Lineweaver-Burk-Auftragung bei nicht kompetitiver Hemmung

So kann man mit Hilfe von Lineweaver-Burk-Auftragungen aus experimentell gemessenen Werten für verschiedene Inhibitorkonzentrationen auf die Wir-

kungsweise des Inhibitors zurückschließen. Zur Beschreibung der Inhibitorwirkung wird auch der IC_{50} -Wert verwendet. Dieser stellt diejenige Konzentration des Inhibitors dar, die notwendig ist, um das Enzym zu 50 % zu hemmen (71).

2.2.3.6.2 Aktivitätsprüfung von Enzymen

2.2.3.6.2.1 Photometrische Analyse

Mit Hilfe von Photometrie kann die Aktivität von Enzymen beurteilt werden. Dazu werden Substrate notwendig, deren Spaltprodukte zur Absorptionsänderung führen. Die Zunahme der Absorption im Laufe einer katalytischen Reaktion wird photometrisch detektiert.

2.2.3.6.2.1.1 „Assay“-Bedingungen für Photometrische Analyse der Dengue-NS3pro-Protease ohne Kofaktor

Als Substrat für die Protease wurde L-BAPA (N- α -Benzoyl-L-Arginin-p-Nitroanilid Hydrochlorid, MW 434,88 g/mol) gewählt. Eine gute Aktivität von Dengue-NS3pro-Protease ohne Kofaktor zu dieser Substanz wurde 2007 beschrieben (17). Das Substrat wurde als 2 mM DMSO-Lösung angesetzt. Die Endkonzentration im 200 μ l Ansatz betrug 100 μ M. Der „Assay“-Puffer wurde wie in Kap. 2.1.10.3.8 beschrieben angesetzt. Wegen der niedrigen Konzentration wurden 50 μ l der DENV2-NS3pro-Protease für die Einzelmessung notwendig. Die Änderung der Absorption durch L-BAPA-Spaltprodukt p-Nitroanilin wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm über 10 min in 30-Sekunden-Abstand Photometrisch erfasst. Der Ansatz für die Proteasenaktivitätsmessung wurde in folgender Reihenfolge in eine transparente 96-Napf-Mikrotiterplatte pipettiert und gut durchmischt. Gleich danach erfolgte die Messung.

130 μ l	„Assay“-Puffer
50 μ l	DENV2-NS3pro-Protease
10 μ l	Inhibitor 1 mM bzw. DMSO
10 μ l	Substrat (L-BAPA) 2 mM
200 μl Gesamtvolumen	

2.2.3.6.2.2 Fluorometrische Analyse

Mit Hilfe der Fluorometrie können die Aktivität der Dengue-Virus-Protease, sowie die Hemmeigenschaften der Proteaseinhibitoren beurteilt werden. Dabei werden Substrate benutzt, bei deren Spaltung durch Protease fluoreszierende Produkte entstehen. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes (F) wird durch ein Fluorometer detektiert. In nachfolgenden „Assays“ wird die Fluoreszenzzunahme [dF] gemessen, die durch Anhäufung der Substratspaltprodukte im Reaktionsansatz während der Messzeit entsteht. Diese entspricht der Umsatzgeschwindigkeit [dF/min].

2.2.3.6.2.2.1 „Assay“-Bedingungen für flourometrische Analyse der Dengue-NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease

Der „Assay“-Puffer wurde wie in Kap. 2.1.10.3.9 ausgeführt angesetzt. Die Zusammensetzung des „Assay“-Puffers wurde von Steuer et al. (2009) übernommen (72). Als Substrat für die Protease wurde Boc-Gly-Arg-Arg-7-Amino-4-Methylcumarin, HCl (MW=644,73 g/mol) der Firma Bachem synthetisiert und als 4 mM DMSO-Lösung angesetzt. Die Endkonzentrationen im 200 µl Reaktionsansatz betrug 100 µM. Der Ansatz für die fluorometrische Analyse wurde in folgender Reihenfolge in eine weiße 96-Napf-Mikrotiterplatte pipettiert und gut durchmischt. Gleich danach erfolgte die Messung.

190 µl	„Assay“-Puffer
5 µl	DENV2-NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease
5 µl	Substrat (Boc-Gly-Arg-Arg-AMC) 4 mM
200 µl Gesamtvolumen	

Einstellungen am Fluorometer:

Gerät	Varian Cary Eclipse
Anregungswellenlänge	380 nm
Detektionswellenlänge	460 nm
Ex. Slit	10 nm
Em. Slit	20 nm
Detektor	auf 450 V
Temperatur	25 °C

Die in der Messung erfasste Fluoreszenzzunahme in Abhängigkeit von der Zeit wurde von der Cary Eclipse Software (© Agilent Technologies, Inc. 1999, 2000 and 2011-2012) in Form einer Geraden dargestellt. Die Steigung der Geraden wurde abgelesen. Die Proteasestammlösung wurde solange verdünnt bis eine Steigung von ca. 20 dF/min erzielt wurde. Im Anschluss wurde eine Messung zur Bestimmung des Km-Wertes durchgeführt.

2.2.3.6.2.2.2 Km-Bestimmung

Für die Km-Bestimmung von der Dengue-NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease wurde eine Substratverdünnungsreihe so angesetzt, dass die Endkonzentrationen in 200 µl Reaktionsansatz 0, 10, 25, 50, 100, 150, 200 oder 250 µM betragen haben. Der Ansatz wurde in bereits beschriebener Reihenfolge und mit gleichen Volumina in eine weiße 96-Napf-Mikrotiterplatte doppelt pipettiert und gut durchmischt. Gleich danach erfolgte die Messung.

Die Ergebnisse wurden mit dem GraFit5-Programm (© Erithacus Software Limited, 1989–2001) analysiert. Die Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen wurden ausgerechnet und der Km-Wert durch nichtlineare Regression ermittelt.

2.2.3.6.3 Fluorimetrische Analyse von Proteaseinhibitoren

2.2.3.6.3.1 Inhibitorentestung

Die Inhibitoren wurden als 20 mM Lösungen angesetzt und für die Analyse auf 2 mM mit DMSO verdünnt. Die Endkonzentration im 200 µl Ansatz betrug 50 µM. Die Proteasestammlösung wurde solange verdünnt bis eine Steigung von ca. 20 dF/min erzielt wurde. Alle Messungen erfolgten in weißen 96-Napf-Mikrotiterplatten. Die Geräteeinstellungen sind in Kap. 2.2.3.6.2.2.1 angegeben.

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

185 µl	„Assay“-Puffer
5 µl	DENV2-NS3pro-Protease
5 µl	Inhibitor 1 mM bzw. DMSO
5 µl	Substrat (L-BAPA) 2 mM
200 µl Gesamtvolumen	

Die Inhibitorentestung erfolgte als Doppelbestimmung. Zwei Reihen von jeweils 8 Reaktionsansätzen wurden pipettiert, wobei die erste und die letzte Probe DMSO statt Inhibitor enthielten und als Referenzproben dienten. Außerdem wurde die zweite Reihe in gegenläufiger Richtung pipettiert, um den Fehler durch die zum Ende der Reihe länger werdende Inkubationszeit auszugleichen. Es wurde ohne Vorinkubation über zehn Minuten im Minutenabstand gemessen. Im Anschluss wurden die Messungen mit Hilfe von Excel Programm (Microsoft Corporation Software, 2010) ausgewertet. Für jede Probe wurde zuerst die Steigung der Regressionsgeraden und anschließend die Mittelwerte der Steigungen aus 2 Messungen errechnet. Die prozentuale Hemmung der Inhibitoren konnte unter Bezugnahme des Mittelwertes der Referenzprobe bestimmt werden.

2.2.3.6.3.2 Korrekturmessung

Die Korrekturmessung war notwendig, um die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch die Fluoreszenzlöschung („Quenching“) des Inhibitors zu berücksichtigen (Abb. 17). Diese kann z.B. durch Bildung eines Fluorophor-Inhibitorkomplexes (statische Löschung) oder durch Energieübertragung vom angeregten Fluoreszenzdonor auf den Inhibitor beim Zusammenstoßen dieser geschehen (dynamische Löschung) (73) (74).

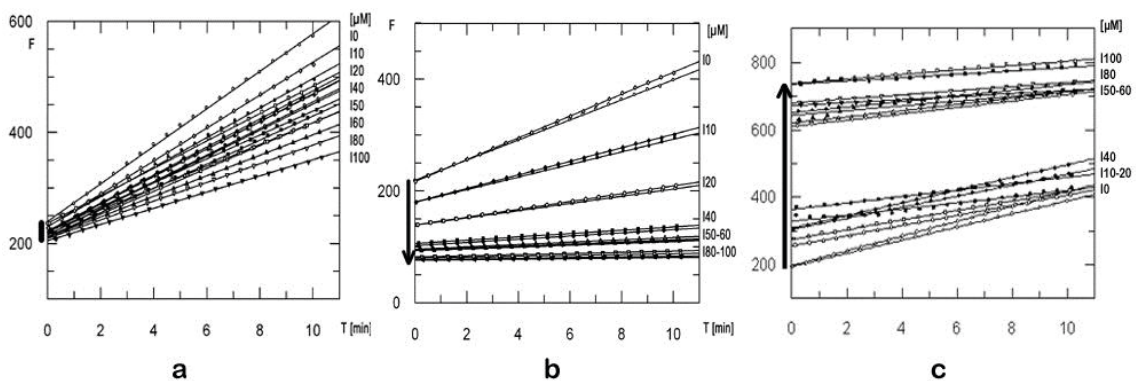


Abbildung 17 a-c: Beispiele von Graphen, bei denen eine (b), keine (a) Fluoreszenzlöschung zu sehen ist bzw. der Inhibitor eine Eigenfluoreszenz zeigt (c). Die Intensität soll bei 0 min bei allen Inhibitorkonzentrationen ungefähr den gleichen Wert aufweisen (a). Sinkt die Intensität mit steigender Inhibitorkonzentration (b), ist von einer Fluoreszenzlöschung der Substanz auszugehen. Steigt die Intensität bei höheren Inhibitorkonzentrationen (c), so ist das auf die Eigenfluoreszenz der Substanz zurückzuführen.

Bei der Korrekturmessung wurde in gleicher Weise vorgegangen, wie bei der Testungsmessung. Allerdings wurde für die Messung statt Boc-Gly-Arg-Arg-AMC nur der Fluoreszenzdonor AMC genommen. Der Ansatz für Korrekturmessung war:

190 µl	„Assay“-Puffer
5 µl	Inhibitor 2 mM bzw. DMSO
5 µl	AMC 40 µM
200 µl Gesamtvolumen	

Die Mittelwerte der Intensität wurden für jede Probe ermittelt. Der Mittelwert der Inhibitorprobe wurde durch den Mittelwert der DMSO-Referenzprobe geteilt und so der Korrekturfaktor errechnet. Liegt der Korrekturfaktor bei eins besteht keine Fluoreszenzlöschung durch Inhibitor, ist er kleiner eins, so ist von einer falsch positiven Hemmung aufgrund der Fluoreszenzlöschung auszugehen. Bei Korrekturfaktor über eins liegt Eigenfluoreszenz vor.

Die bei den Tests ermittelten Steigungen wurden durch die Korrekturfaktoren der jeweiligen Proben dividiert und die Hemmung neu berechnet.

2.2.3.6.3.3 Bestimmung des IC_{50} -Wertes

Zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes eines Inhibitors wurde eine Verdünnungsreihe von diesem so angesetzt, dass die Endkonzentrationen im 200 µl Ansatz jeweils 0, 10, 20, 40, 50, 60, 80 oder 100 µM betragen haben. Dazu wurde die 20 mM Inhibitorstammlösung zuerst 1:5 mit DMSO auf 4 mM verdünnt (320 µl DMSO + 80µl Inhibitor = 360 µl) und anschließend nach angegebener Schema weiterverdünnt (Tabelle 5).

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammenpipettiert:

185 µl	„Assay“-Puffer
5 µl	DENV2-Protease
5 µl	Inhibitor
5 µl	Substrat (Boc-Gly-Arg-Arg-AMC) 100 µM Endkonzentration
200 µl Gesamtvolumen	

Inhibitor 4 mM [μ l]	DMSO [μ l]	Vorläufige Konzentration [μ M]	Verdünnung im 200 μ l Ansatz	Endkonzentration im 200 μ l Ansatz [μ M]
0	100	0	1:40	0
10	90	400		10
20	80	800		20
40	60	1600		40
50	50	2000		50
60	40	2400		60
80	20	3200		80
100	0	4000		100
$\Sigma=360$				

Tabelle 5: Inhibitorverdünnungsschema

Enzym- und Substratkonzentration waren in jedem Ansatz konstant. Auch hier wurde eine Korrekturmessung durchgeführt vgl. Kap. 2.2.3.6.3.2. Jede Messung erfolgte als Doppelmessung. Die Ergebnisse wurden anschließend mit den GraFit 5 und GraphPad Prism 6 (© 1995-2014 GraphPad Software, Inc.) Programmen analysiert.

2.2.3.6.3.4 Bestimmung von K_m und V_{max} , Auftragung nach Lineweaver-Burk und Beurteilung der Wirkungsweise

Um die Wirkungsweise der Inhibitoren beurteilen zu können wurden mehrere Messreihen bei konstanter Inhibitorkonzentration und variablen Substratkonzentrationen durchgeführt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Substrats so angesetzt, dass die Endkonzentrationen im 200 μ l Ansatz 10 bis 100 μ M betragen. Die Reihen wurden bei den Inhibitorkonzentrationen von 0, 40, 60 oder 100 μ M bzw. an die IC_{50} angepassten Konzentrationen, gemessen. Der Ansatz wurde wie bereits in Kap. 2.2.3.6.3.1 beschrieben zusammengesetzt. Jede Messung erfolgte als Doppelmessung.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten (Steigungen) bei konstanter Inhibitorkonzentration und unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden ausgerechnet mit Hilfe des GraFit5-Programms in einem Graphen zusammengefasst und der Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeitskurven beurteilt. Anschließend wurden

aus den Steigungen die K_m - und V_{max} -Werte für jede Inhibitorkonzentration bestimmt. Deren Verhalten wurde analysiert: blieb V_{max} stabil und K_m wurde größer mit steigender Inhibitorkonzentration, so handelte es sich um eine kompetitive Hemmung, blieb K_m konstant, während V_{max} abnahm, wurde von einer nichtkompetitiven Hemmung ausgegangen.

Für die Auftragung nach Lineweaver-Burk wurden Reaktionsgeschwindigkeitswerte (V) sowie Substratkonzentrationswerte (S) bei jeder Inhibitorkonzentration in $1/V$ und $1/S$ umgerechnet und in Form eines Graphen ($1/V$ gegen $1/S$) dargestellt.

Der Inhibitor wurde anhand der Lineweaver-Burk-Auftragung sowie des K_m - und V_{max} -Verhaltens bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bezüglich seines Hemmverhaltens beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung der DENV2-Proteasese

3.1.1 Herstellung der DENV2-Protease mit dem kompletten NS2B-Kofaktor

3.1.1.1 PCR-Amplifizierung von DENV2-Proteasesequenzen, Herstellung des DENV2-Protease kodierenden Klons, Expression und Aufreinigung der Protease

Um DENV2-Protease zu klonieren wurde mit den Primern (2.1.4) und der Matrizen DNA PCR durchgeführt. Dabei sind PCR-Produkte folgender Länge entstanden (Abbildung 18):

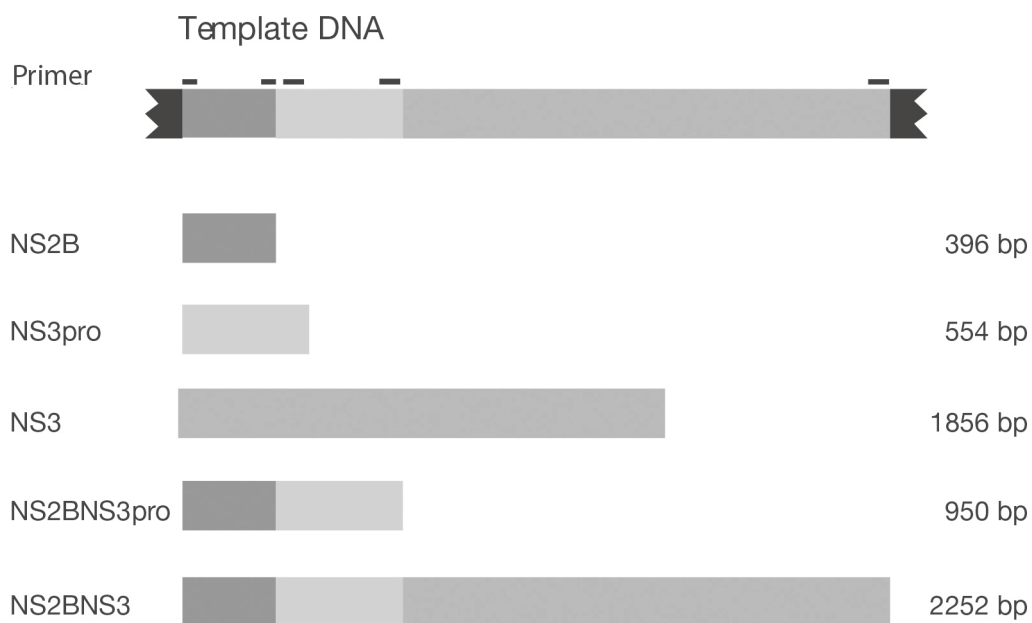


Abbildung 18: PCR-amplifizierte DENV2-Proteasesequenzen

Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe des PureLink™ PCR Purification Kits (Invitrogen) aufgereinigt (2.2.1.2) und mit Hilfe des *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits* von Invitrogen in pET200/D-TOPO-Vektor kloniert (2.2.1.3). Der NS2B-Amplifikat wurde außerdem in den pET101/D-TOPO-Vektor kloniert. Danach erfolgte eine Transformation des *One Shot®*

Ergebnisse

TOP10 E. colis mit den *TOPO*® Klonierungsprodukten (2.2.1.5). Von den ÜN gewachsenen Kolonien wurden 3ml-Kulturen angeimpft und 16 h bebrütet. Am nächsten Tag wurde Plasmid-DNA durch Minipräparation gewonnen (2.2.1.7) und mit Hilfe von Restriktionsverdau (2.2.1.10) und Agarosegelelektrophorese (2.2.1.11) analysiert (Abbildung 19, 20).

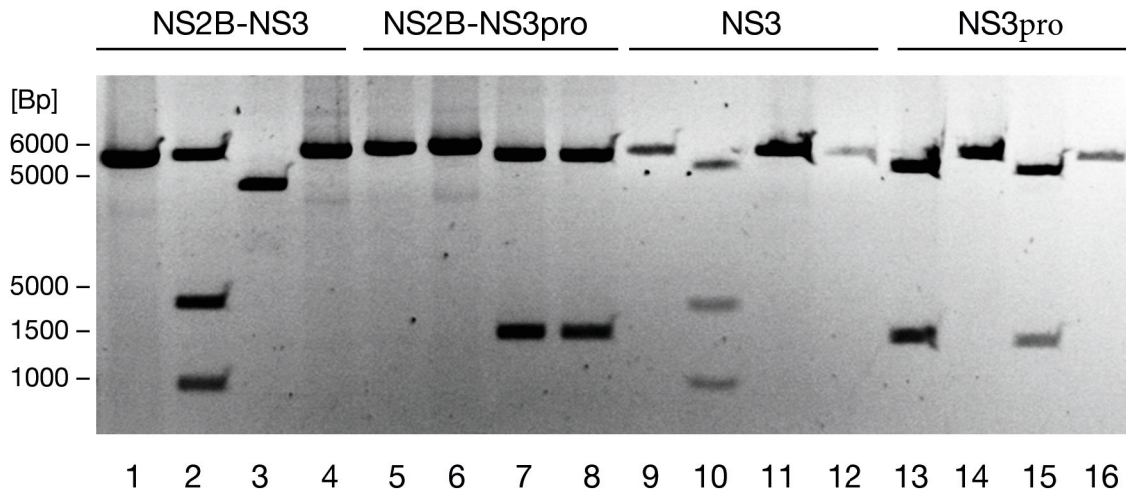


Abbildung 19: Restriktionsverdau von 16 Klonen - pET200/D-TOPO mit DENV2-Proteaseinserts - mit BstBI. Proben mit den insertpositiven Klonen waren: 2, 7, 8, 10, 13, 14. Die Größen der dabei entstandenen Fragmente waren für NS2B-NS3 5300/1700/1000 Bp, für NS2B-NS3pro 5000/1660 Bp und für NS3 4900/1700/1000 Bp, für NS3pro 4600/1600 Bp (abgerundet angegeben).

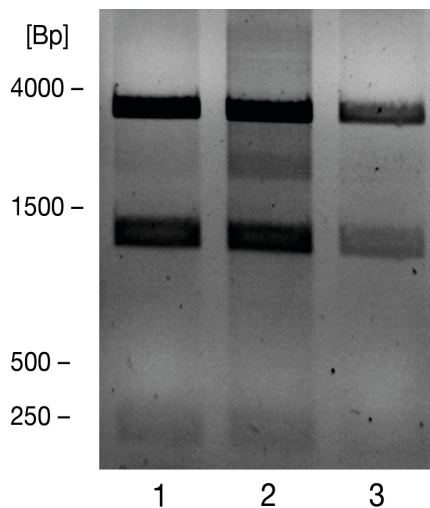


Abbildung 20: Verdau von drei pET101/D-TOPO-Klonen mit NS2B-„Insert“ mit EcoRV. Proben 1-3. Die Größen der dabei entstandenen Fragmente waren 4230/ 1490/ 324 Bp.

Die „Insert“ enthaltende Plasmide wurden für die Maxipräparation (vgl. Kap

2.2.1.8) in einer 250 ml ÜN-Kultur weiter vermehrt. Mit der Plasmid-DNA wurden BL21-star *E. coli* transformiert (vgl. Kap. 2.2.1.5). Es wurden insgesamt 6 verschiedene BL21-Star *E. coli* Stämme gezüchtet: vier mit pET200/D-TOPO mit jeweils NS3, NS2B-NS3pro, NS3pro- oder NS2B-NS3-„Inserts“, einer mit pET101/D-TOPO mit NS2B-„Insert“ und einer mit pET200/D-TOPO mit NS3pro-„Insert“ und pET101/D-TOPO mit NS2B-„Insert“ zusammen.

Die Überlegung bei den NS2B, NS3pro und NS3 exprimierenden Bakterienstämmen sowie dem Stamm mit zwei Plasmiden (NS2B in pET101/D-TOPO und NS3pro in pET200/D-TOPO) war, dass die exprimierten und denaturierend aufgereinigten Proteine bei der Renaturierung während der Dialyse zu einer aktiven Proteasenform gefaltet werden, NS2B-NS3pro bzw. NS2B-NS3. Bei den pET200/D-TOPO-NS2B-NS3pro und -NS2B-NS3 enthaltenden Stämmen wurde erhofft, dass die während der Proteinsynthese entstandene DENV2-Protease durch Autokatalyse (Abbildung 4B, Schnittstellen der viralen Protease) in aktive Konformation überführt wird und anschließend aufgereinigt werden kann (75).

Die Kolonien wurden in einer Übernachtskultur für die anschließende Proteingewinnung weitervermehrt. Proteinherstellung erfolgte wie im 2.2.2.1 beschrieben. Anschließend wurden die Proteine denaturierend aufgereinigt (2.2.2.2) und der Syntheserfolg mit Hilfe von Western-Blot (2.2.2.6) überprüft.

Von den sechs BL21-Star *E. coli* Stämme ließ sich nur bei pET200/D-TOPO-NS3pro- und pET101/D-TOPO-NS2B-Plasmiden eine Proteinexpression zeigen (Abbildung 21, 22). Die Proteinexpression von NS2B-NS3pro und NS2B-NS3 gelang nicht, trotz erfolgreicher Klonierung. Das Versagen der herkömmlichen Proteinherstellungsmethoden bei NS3pro-Protease mit komplettem NS2B aufgrund mangelnder Proteinexpression und genetischer Instabilität der Klone wurde von Choksupmanee et. al., 2012 beschrieben (76), obwohl es auch Quellen gibt, die über ein positives Ergebnis berichten (77).

Bei dem Stamm mit zwei Plasmiden (NS2B in pET101/D-TOPO und NS3pro in pET200/D-TOPO) wurde nur NS3pro exprimiert, so dass das auch hier gewünschte Ergebnis, eine aktive Protease mit komplettem Kofaktor zu bekommen, misslang (Abbildung 23).

Ergebnisse

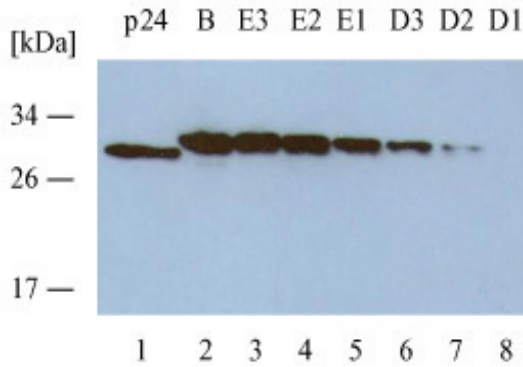


Abbildung 21: Nachweis der NS3pro-Expression mittels Western-Blot nach einer denaturierenden Proteinaufreinigung unter Verwendung eines 12,5 % SDS-Polyakrylamidgels. Dargestellt sind Proben 1-8: Kontrollprobe 1 (p24, MW 24 kDa), Probe 2: „Beads“ (B), Proben 3-8: Eluate (D1-3, E1-3). Die NS3pro-Bande ist in den Eluaten D2-E3 und „Beads“ bei ca 25 kDa ausgehend von der Kontrollprobe deutlich zu sehen.

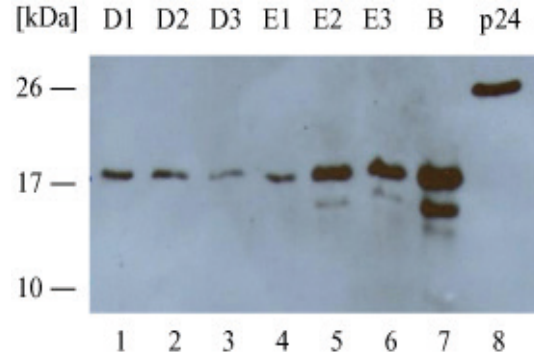


Abbildung 22: Nachweis der NS2B-Expression mittels Western-Blot nach einer denaturierenden Proteinaufreinigung unter Verwendung eines 12,5 % SDS-Polyakrylamidgels. Dargestellt sind Proben 1-8: Probe 1-6 Eluate (D1-3, E1-3), Probe 7 „Beads“ (B) und Kontrollprobe 8 (p24, MW 24 kDa). Die NS2B-Bande ist in den Eluaten D1-E3 und „Beads“ bei ca. 18 kDa zu sehen.

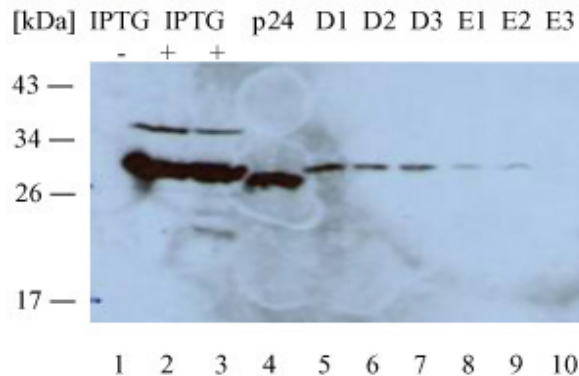


Abbildung 23: Nachweis der NS3pro- und NS2B-Expression mittels Western-Blot nach einer denaturierenden Proteinaufreinigung unter Verwendung eines 12,5 % SDS-Polyakrylamidgels. Dargestellt sind Proben 1-10: Probe 1 vor der IPTG-Zugabe (IPTG -), Proben 2-3 nach IPTG-Zugabe (IPTG +), Kontrollprobe 4 (p24, MW 24 kDa), Proben 5-10: Eluate (D1-3, E1-3). Eine NS3pro-Expression ist in den Proben nach IPTG-Zugabe bei ca. 25 kDa ausgehend von der Kontrollprobe deutlich zu sehen. Auch Eluate D1-E2 zeigen NS3pro-Bande. Eine NS2B Expression ist nicht nachweisbar.

Der im Western-Blot benutzter Proteinmarker - Page Ruler Unstained Protein Ladder - gilt als nicht sehr genau. Aus diesem Grund und als Positivkontrolle wurde der HIV-p24 Proteinlösung mit einem Molekulargewicht von 24 kDa mitaufgetragen.

Ergebnisse

Protein	MW von reinem Protein [kDa] abgerundet	MW von Protein mit His-Tag und Vektoranteil [kDa] abgerundet
NS2B	15	18
NS3pro	21	25
NS3	69	73
NS2B-NS3pro	35	39
<i>NS2B-NS3</i>	84	87
<i>NS2B-polyGly-NS3pro</i>	28	29

Tabelle 6: Rechnerisch ermitteltes Molekulargewicht der exprimierten Proteine

Die denaturierend aufgereinigte NS2B und NS3pro Proteine wurden, wie in Kap. 2.2.2.7 beschrieben, zusammen dialysiert. Dadurch wurde die Entstehung einer aktiven Proteasenkonformation erhofft. Allerdings führte die Entfernung des Harnstoffes zum Auskristallisieren der Proteine, was sie unbrauchbar für weitere Analysen machte. Ein Grund dafür könnte eine zu niedrige NaCl-Konzentration im zweiten Dialyse-Puffer sein (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), ad 1 l ddH₂O) oder ein zu alkalischer pH-Wert. Von manchen Autoren beschriebenen Dialysepuffer enthielten 300 mM NaCl und 100 mM Tris-HCl bei einem pH-Wert bis max 8,0 (75, 77).

Als Konsequenz wurde ein alternatives Proteinaufreinigungsverfahren verfolgt. Es wurde die Methode von Nall et al., 2004 übernommen (78), siehe auch Kap. 2.2.2.3 – native Proteinaufreinigung, bei der die Notwendigkeit der Dialyse entfällt. Hierzu wurde nur NS3pro Protein erneut exprimiert und nach der neuen Methode aufgereinigt (Abbildung 24). Auf eine NS2B-Synthese wurde bis zum Ergebnis der Aktivitätsmessung der NS3pro und aufgrund von Literaturhinweisen, dass das komplette NS2B-Protein nur in Anwesenheit der Membranlipide die NS3pro-Protease aktiviert (76, 79), verzichtet.

Aufgrund einer geringen Ausbeute, wurden alle NS3pro-Eluate vereinigt und mit Hilfe von *Microcep™ 3K Omega* Ultrafiltrationsröhrchen nach Anleitung des Herstellers aufkonzentriert (Pall Life Sciences, Microsep™ Advance Centrifugal Devices). Die Endkonzentration der Proteasenlösung wurde nach der Bradford-Methode (2.2.2.8) ermittelt und betrug ca. 1,4 µg/µl. Die aufgereinigte Protease

wurde anschließend in einem Enzym-„Assay“ auf Aktivität geprüft (3.2).

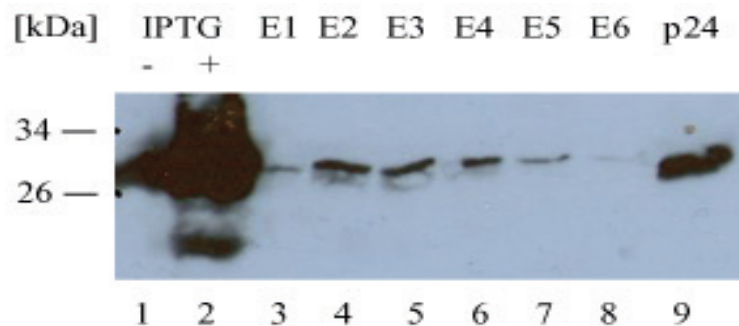


Abbildung 24: Nachweis der NS3pro-Expression mittels Western-Blot nach einer nativen Proteinaufreinigung unter Verwendung eines 12,5 % SDS-Polyakrylamidgels. Dargestellt sind Proben 1-9: Probe 1: vor der IPTG-Zugabe (IPTG -), Probe 2: nach IPTG-Zugabe (IPTG +), Proben 3-8: Eluate (E1-6) und Kontrollprobe 9 (p24, MW 24 kDa). NS3pro-Expression ist in den Proben nach IPTG-Zugabe leicht oberhalb der p24-Kontrollbande zu sehen.

3.1.2 Expression und Aufreinigung des NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Proteasenkonstruktes von DENV2

Ein weiterer DENV2-Protease enthaltender Klon (NS2B-Gly-Linker-NS3pro im pET28a-Vektor in BL21 *E. coli*) wurde von dem Arbeitskreis Klein der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um ein Fusionsprotein aus Kofaktor (NS2B 49-93) und Protease-Domäne (NS3pro 1-194), die mit Hilfe von Gly-Linker miteinander verbunden sind. Dieses Konstrukt enthält nicht den kompletten NS2B-Kofaktor, sondern nur 44 Aminosäuren aus den NS2B-Domänen III-V, da diese bereits zur Proteaseaktivierung genügen (17, 44, 45). Der klontragende Vektor besitzt eine Polyhistidinregion – His-Tag (6xHis) und wird bei der Proteinsynthese mittranslatiert (Abbildung 25).

Das NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protein wurde exprimiert und nativ aufgereinigt (siehe Kap. 2.2.2.3). Zum Proteinnachweis wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung (Kap. 2.2.2.5) durchgeführt (Abbildung 26). Das rechnerisch ermittelte MW der rekombinanten DENV2-Protease ist 29 kDa. Die Proteinkonzentration der einzelnen Eluate wurde nach der Bradford-Methode (2.2.2.8) bestimmt (Tabelle 7).

Ergebnisse

Vektor-Schnittstelle-**NcoI**-**NS2B**-Gly-Linker-**NS3pro**-**SacI**-Schnittstelle-Vektor-**His-Tag**

```

      Vektor 49 NS2B
      MADLELERAADVkwEDQAEISGSSPILSIT

      93 Gly-Linker 1
      ISEdGMSIKNEEEEGGGGSGGGAGVLWDVPSPPPVGK

      NS3pro 51
      AELEDGAYRIKQKGILGYSQIGAGVYKEGTFHTMWHVT

      75
      RGAVLMHKGKRIEPSWADVKKDLISYGGGWKLEGEWK

      EGEEVQVLALEPGKNPRAVQTKPGLFKTNAGTIGAVSLD

      135
      FSPGTSgSPIIDKKGKVVGLYGNGVVTRSGAYVSAIAQTE

      194 Vektor His-Tag
      KSIEDNPEIEDDIFRKLvPRGSTSSVDKLAAALEHHHHH*
  
```

Abbildung 25: Schematische Darstellung des DENV2-Proteasekonstruktes. Die AS-Sequenz des synthetisierten NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Proteins sind: dargestellt in Blau das NS2B-Kofaktor, in Grün Gly-Linker, in Schwarz NS3pro-Protease, in Rot katalytische Triade H51, D75, S135, in Gelb Vektor-Schnittstellen und in Lila His-Tag.

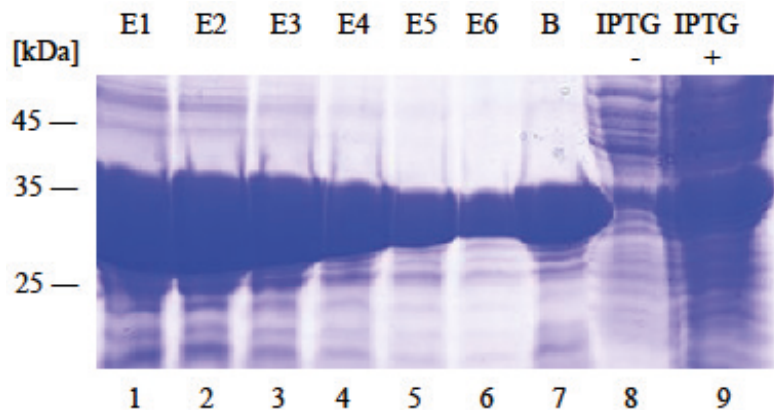


Abbildung 26: Nachweis der NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Proteinexpression mittels Coomassie Färbung nach einer nativen Proteinaufreinigung. Dargestellt sind Proben 1-9: Proben 1-6: Eluate (E1-E6), Probe 7 „Beads“ (B), Probe 8 vor der IPTG-Zugabe (IPTG -), Probe 9 nach IPTG-Zugabe (IPTG +). Deutliche Proteinexpression ist in der Probe 9 nach IPTG-Zugabe zu sehen. Eine Breite NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Proteinbande ist in den Eluaten E1-E6 und „Beads“ in der Höhe zwischen 25 und 35 kDa nachweisbar.

Eluat	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
E1	11,6
E2	10,4
E3	7,0
E4	4,0
E5	1,8
E6	0,2

Tabelle 7: Nach der Bradford-Methode ermittelte Proteinkonzentrationen der Eluate E1-E6 in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.2 Aktivitätsprüfung der DENV2-Protease

Nach der Aufreinigung wurden NS3pro- und NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Proteasen in einem Enzym-„Assay“ auf Aktivität geprüft (vgl. Kap. 2.2.3.6.2.1.1 und 2.2.3.6.2.2). Als erstes wurden die „Assay“-Puffer an die Proteasen und Substrate angepasst. Für die photometrische Analyse der NS3pro-Protease mit L-BAPA als Substrat wurden die folgenden drei Puffer und zwei Proteasekonzentrationen untersucht:

Puffer:

1. 50 mM TRIS-Puffer (pH 8,0), 50 mM NaCl ad 1 l dd H₂O
2. 50 mM TRIS-Puffer (pH 8,0) ad 1 l dd H₂O
3. 50 mM TRIS-Puffer (pH 9,0), 10 % Ethylenglykol, 0,0016 % Brij ad 1 l ddH₂O

Proteasekonzentrationen:

- a. $\sim 0,35 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (5 μl in 200 μl Ansatz);
- b. $\sim 3,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (50 μl in 200 μl Ansatz).

Bei Zugabe der Substrat-DMSO-Lösung zum ersten Puffer, ist das Substrat ausgefallen, während es beim zweiten und dritten Puffer in Lösung blieb. Die Aktivitätsmessung wurde somit mit den beiden letzten Puffern durchgeführt. Die Proteasekonzentration von $\sim 0,35 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ war zu klein (Abbildung 27 a), aus diesem Grund wurde ihre Menge im Ansatz verzehnfacht. Dies führte zu guten Messergebnissen (Abbildung 27 b-c). Die Messung mit dem dritten Puffer lieferte bessere Messwerte mit kleinerer Abweichung (vgl. Abb. 27c), die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit aus zwei Messungen war allerdings bei beiden Puffern ungefähr gleich. Somit scheint Puffer 3 für die Inhibitorentestung besser geeignet zu sein.

Ergebnisse

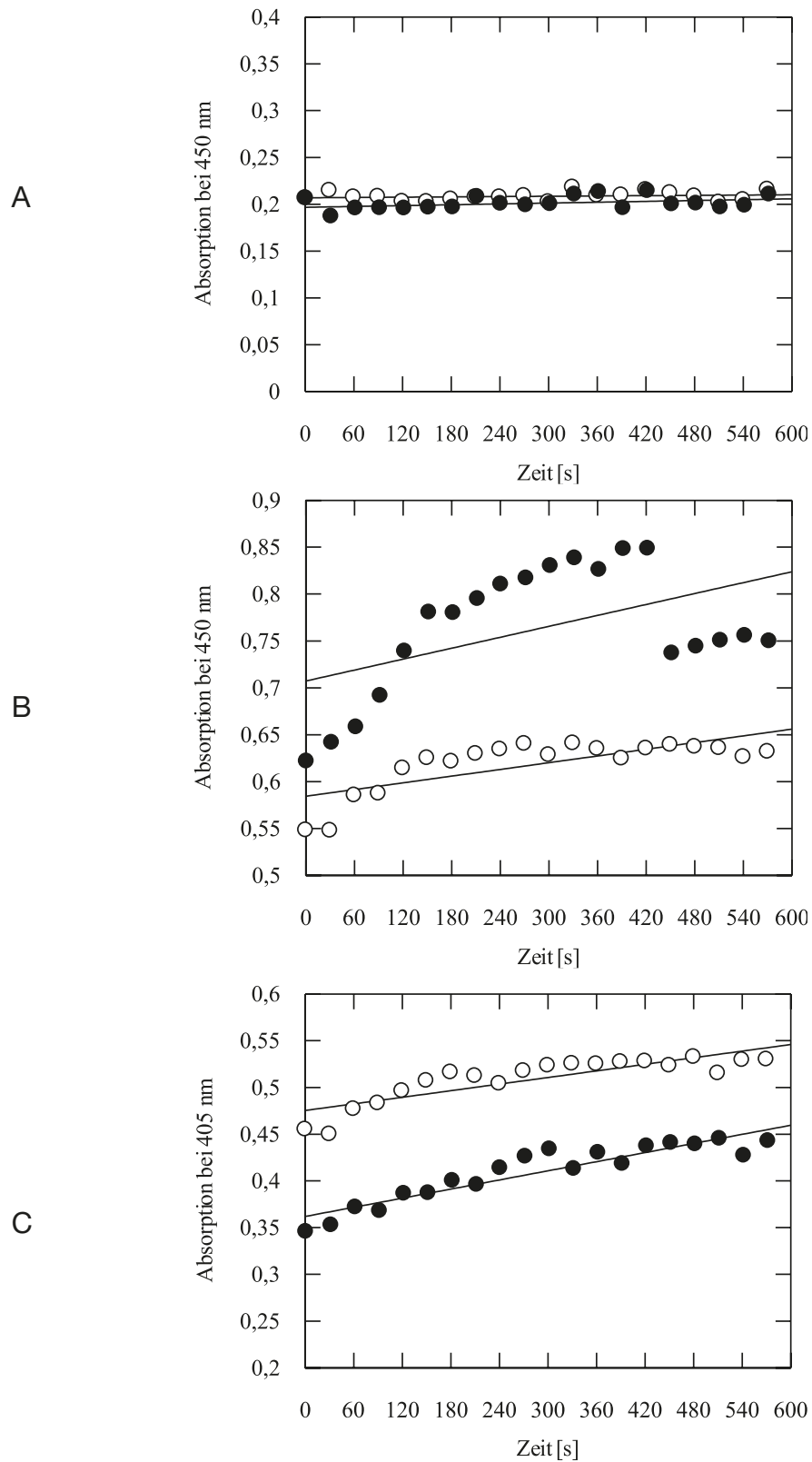


Abbildung 27a-c: Aktivitätsprüfung von NS3pro-Protease mittels Photometrie mit L-BAPA als Substrat. Änderung der Absorption bei 405 nm zweier Proben in Abhängigkeit von der Zeit (Messabstand 30 s). a) 5 μ l Protease, 50 mM TRIS-Puffer (pH 8,0). b) 50 μ l Protease, 50 mM TRIS-Puffer (pH 8,0). c) 50 μ l Protease, 50 mM TRIS-Puffer (pH 9,0) + 10 % Ethylenglykol + 0,0016 % Brij.

Ergebnisse

Für die NS3pro-GlyLinker-NS2B-Protease wurden zwei Puffer untersucht:

1. 200 mM TRIS-Puffer (pH 9,0), 10 % Ethylenglykol, 0,0016 % Brij ad 1 l ddH₂O
2. 50 mM TRIS-Puffer (pH 9,0), 10 % Ethylenglykol, 0,0016 % Brij ad 1 l dd H₂O

Die Aktivität der Protease war bei 50 mM TRIS höher als bei 200 mM TRIS, deswegen wurde dieser Puffer für die Inhibitorentestung benutzt (Abb. 28).

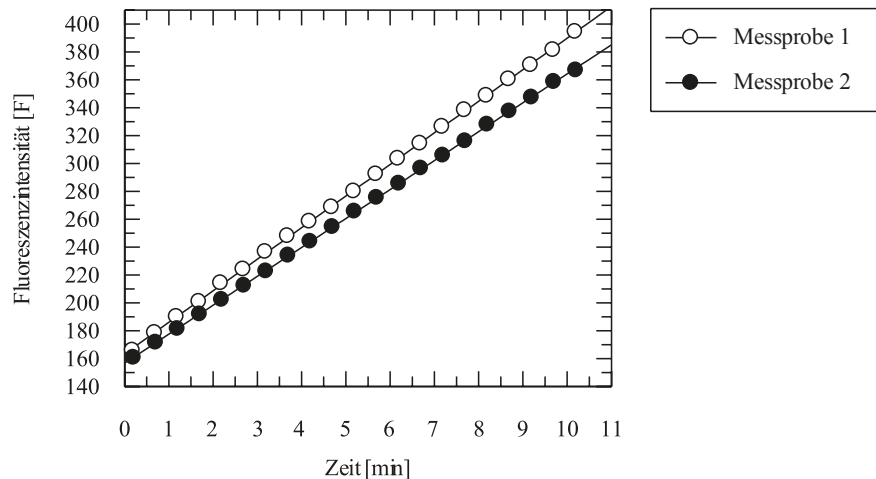


Abbildung 28: Aktivitätsprüfung von NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease mittels Fluorometrie mit Boc-Gly-Arg-Arg-AMC als Substrat (Endkonzentration im Ansatz 100 μ M) und 50 mM TRIS-Puffer (pH 9,0), 10 % Ethylenglykol, 0,0016 % Brij ad 1 l ddH₂O als Puffer. Anstieg der Fluoreszenzintensität zweier Proben in Abhängigkeit von der Zeit (Messabstand 30 s).

Anschließend wurde der Km-Wert von NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease bestimmt (2.2.3.6.2.2) (Abbildung 29). Der ermittelte Km-Wert von NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease betrug $196 \pm 20 \mu$ M.

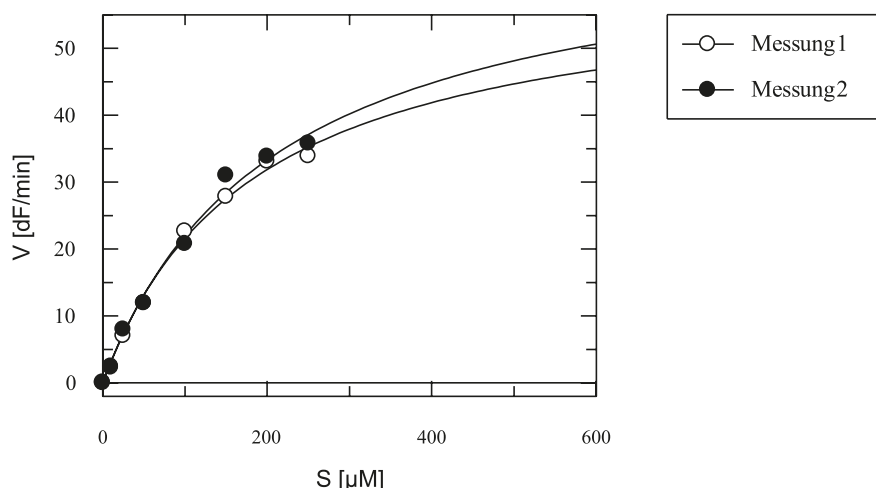


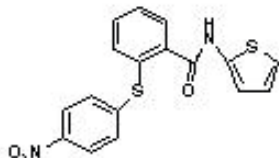
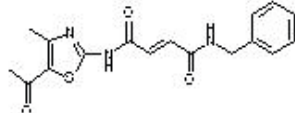
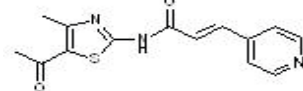
Abbildung 29: Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Km-Wertes von NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease. Graphische Darstellung der ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratreaktionen (Endsubstratkonzentrationen in 200 μ l Reaktionsansatz 0, 10, 25, 50, 100, 150, 200 und 250 μ M). Der Km-Wert wurde durch nichtlineare Regression mit Hilfe des GraFit5-Programms ausgerechnet.

Beide Proteine NS3pro und NS2B-Gly-Linker-NS3pro waren enzymatisch aktiv. Aufgrund dessen, dass NS3pro-Protease ohne Kofaktor in den Tests mit rekombinanten Schnittstellen des DENV2-Polyproteins deutlich weniger aktiv war als das Proteasenkonstrukt (17, 75), wurde sie nicht für das weitere Inhibitoren-Testing gewählt. Die NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease war dagegen bei der Suche nach den neuen Proteaseinhibitoren bereits erfolgreich gewesen (44, 57-59), deshalb wurde sie für die anschließende Inhibitoren-Testing benutzt.

3.3 Identifizierung neuer DENV2-Proteaseinhibitoren

3.3.1 Suche nach einer passenden Substanzklasse

Am Anfang wurde eine Reihe von Inhibitoren verschiedener Substanzklassen *in vitro* in einem fluorometrischen DENV2-Protease-„Assay“ (siehe 2.2.3.6.3.1) auf ihre Wirkung getestet (144 unterschiedliche Verbindungen, siehe Anhang). Die Substanzen wurden bereits zur Hemmung anderen Proteasen verwendet und wiesen eine gewisse Wirkung auf. Z.B. inhibierte TP 38 auch sechs weitere Proteasen: Cathepsin C, B und D, Falcipain 2, Rhodesain, SAP2 (80). Aus dieser Gruppe wurden dann die Substanzen herausgegriffen, die bei Dengue-Protease inhibitorisch wirksam waren (Tabelle 8).

Name	Struktur	MW [g/mol]	Konz. [μ M]	Hemmung [%]	IC ₅₀ [μ M]	Substanzklasse
FM 47		356,43	20	31	99 \pm 1	Diarylthioether
MH 313		343,41	40	47	34 \pm 2	Thiazole
MH 214		287,34	50	45	n.b.	Thiazole

Ergebnisse

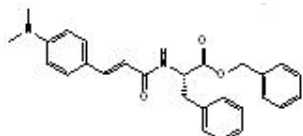
TP 38		428,52	50	52	39±1	Olefine (Zimtsäurederi- vat)
-------	---	--------	----	----	------	------------------------------------

Tabelle 8: Übersicht der getesteten DENV2-wirksamen Verbindungen (n.b.: wurde nicht bestimmt)

MH 313, MH 214 und TP 38 wurden in Vero-Zellkulturen auf Toxizität getestet (vgl. Kap. 3.3.5.1). Die maximale DMSO-Konzentration im Ansatz betrug 0,5%. Es wurde erkannt, dass TP 38 und MH 214 keine Toxizität aufweisen, während MH 313 bei einer Konzentration von 50 μM stark zytotoxisch war (Abbildung 30). Aus diesem Grund wurde der Inhibitor nicht weiter untersucht. FM 47 wurde in der Literatur als toxisch bei 30 μM beschrieben (81).

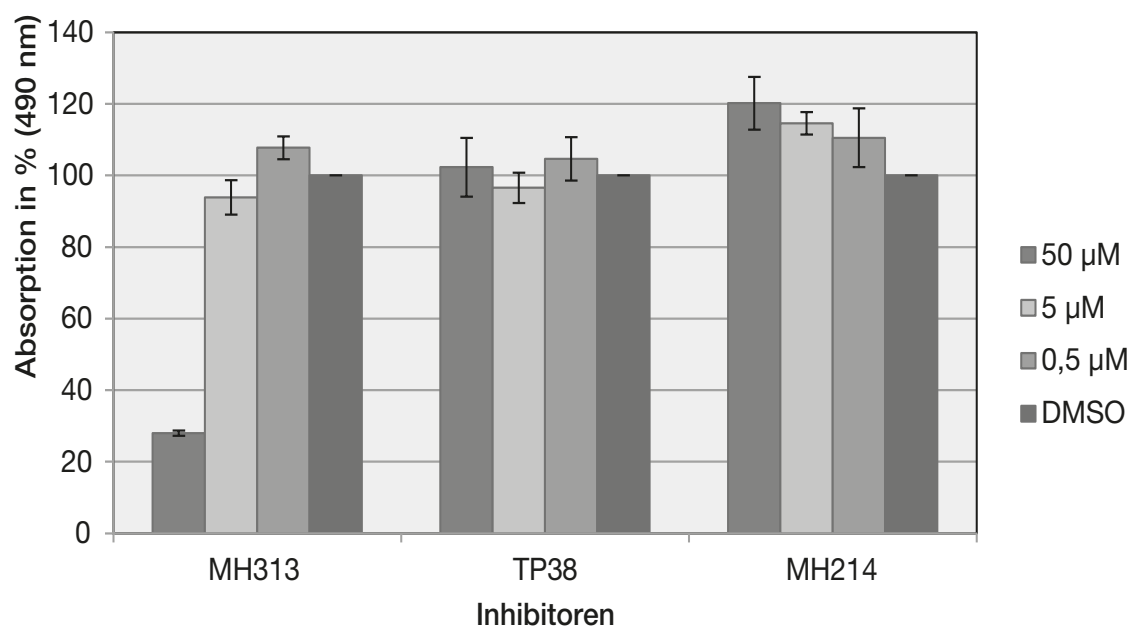


Abbildung 30: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für MH 313, TP 38, MH 214. Darstellung der Absorptionsmittelwerte [%] einer Dreifachmessung bei 50, 5 und 0,5 μM Inhibitorkonzentration sowie bei DMSO statt Inhibitor mit Angabe der Standardabweichung. Als Referenzwert diente DMSO-Wert (100%).

Anschließend wurden FM 47, MH 214 und TP 38 bezüglich ihrer Hemmeigenschaften beurteilt (siehe Kap. 2.2.3.6.3.4).

Bei der Beurteilung errechneter K_m - und V_{max} -Werte bei verschiedenen Konzentrationen von FM 47 sah man eine kontinuierliche Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Inhibitorkonzentration, was für eine nicht-

kompetitive Hemmung von FM 47 spricht (Tabelle 9). Dies bestätigte auch die Auftragung nach Lineweaver-Burk (Abbildung 31).

FM 47		
Inhibitor Konz. [μM]	Km ± Stabw [μM]	Vmax ± Stabw [min/dF]
0	160±16	37±2
40	241±41	36±4
60	200±32	26±3
100	117±32	20±3

Tabelle 9: FM 47. Ermittelte Km- und Vmax-Werte mit Standardabweichungen (Stabw) der 2. Messung für Inhibitorkonzentrationen von 0, 40, 60, 100 μM.

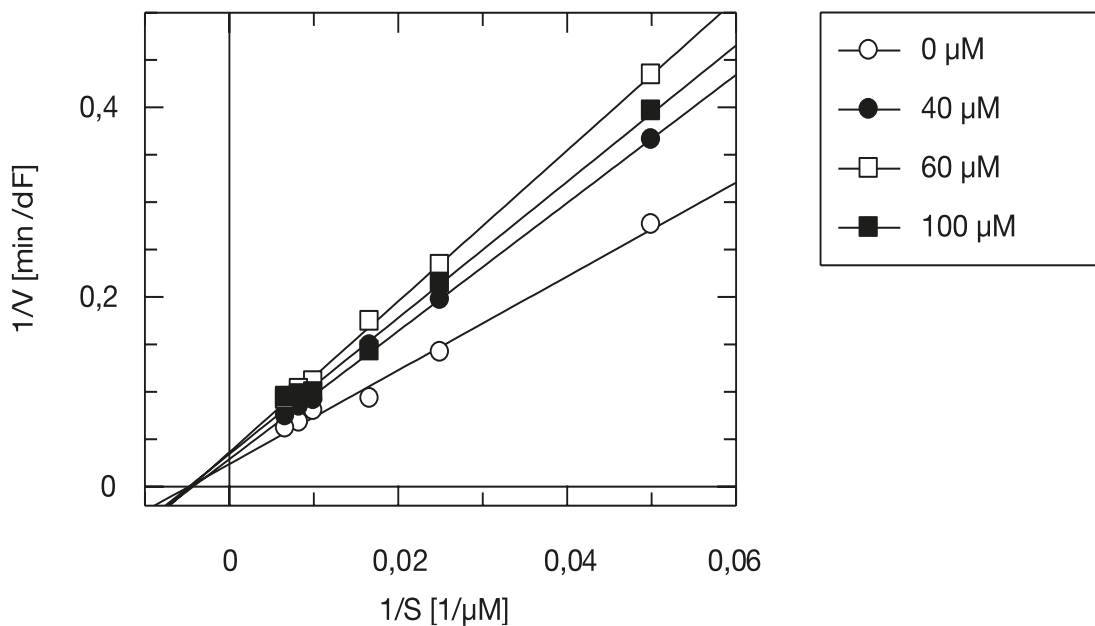


Abbildung 31: : FM 47. Lineweaver-Burk-Auftragung bei Inhibitor-konzentrationen von 0, 40, 60, 100 μM. Der Schnittpunkt der Geraden liegt auf der x-Achse. Es handelt sich um eine nichtkompetitive Hemmung.

Auch MH 214 ist ein nichtkompetitiver Inhibitor. In der Auftragung nach Lineweaver-Burk schneiden sich die Geraden leicht oberhalb der x-Achse (Abbildung 32). Die Analyse der errechneten Km- und Vmax-Werte zeigt die Abnahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Inhibitorkonzentration, während Km annäherungsweise gleich bleibt (Tabelle 10).

MH 214		
Inhibitor Konz. [μM]	Km ± Stabw [μM]	Vmax ± Stabw [min/dF]
0	99±17	46±4
20	117±15	46±3
40	96±23	25±3
60	99±14	30±2
100	85±28	27±4

Tabelle 10: MH 214. Ermittelte Km- und Vmax-Werte mit Standardabweichungen für Inhibitor-konzentrationen von 0, 20, 40, 60, 100 μM der in de Abbildung 34 dargestellten Messungen.

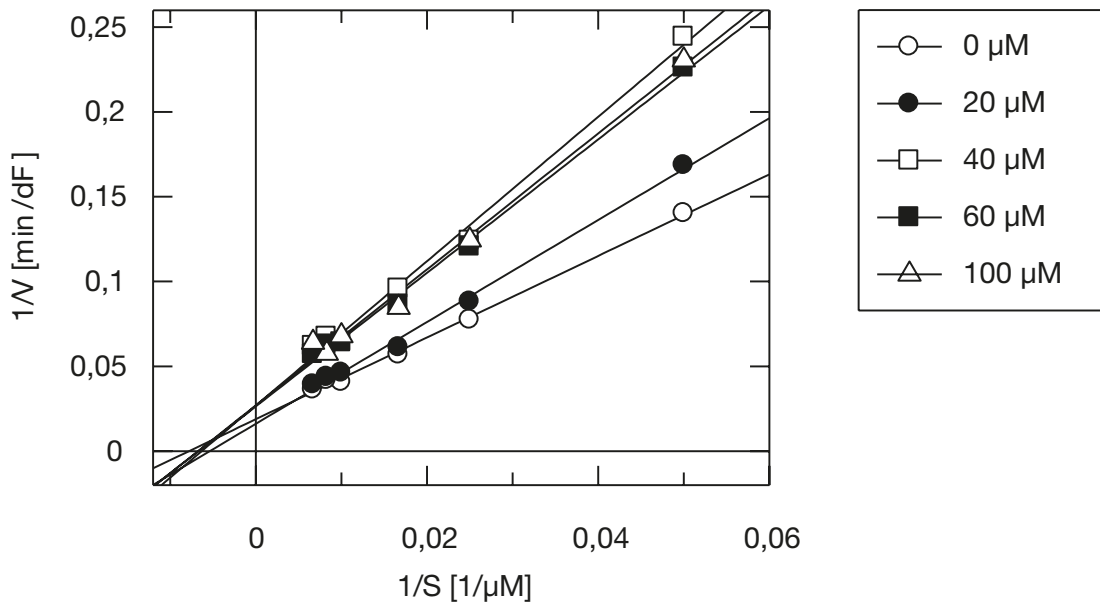


Abbildung 32: MH 214. Lineweaver-Burk-Auftragung bei Inhibitor-konzentrationen von 0, 20, 40, 60, 100 μM. Der Schnittpunkt der Geraden liegt oberhalb der x-Achse. Es handelt sich um eine nichtkompetitive Hemmung.

Nach der Auswertung einer Dreifachmessung ist TP 38 ein kompetitiver Inhibitor. Man sieht eine Zunahme von Km mit steigender Inhibitor-konzentration, während Vmax ungefähr gleich bleibt (Tabelle 11). In der Lineweaver-Burk Auftragung schneiden sich die Geraden auf der Y-Achse (Abbildung 33).

TP 38		
Inhibitor Konz. [μM]	$K_m \pm \text{Stabw}$ [μM]	$V_{\text{max}} \pm \text{Stabw}$ [min/dF]
0	87 ± 17	37 ± 3
40	100 ± 31	33 ± 5
60	152 ± 48	37 ± 7
100	183 ± 88	27 ± 8

Tabelle 11: TP 38. Ermittelte K_m - und V_{max} -Werte mit Standardabweichungen (Stabw) für Inhibitorkonzentrationen von 0, 40, 60, 100 μM der im Abbildung 36 dargestellten Messungen.

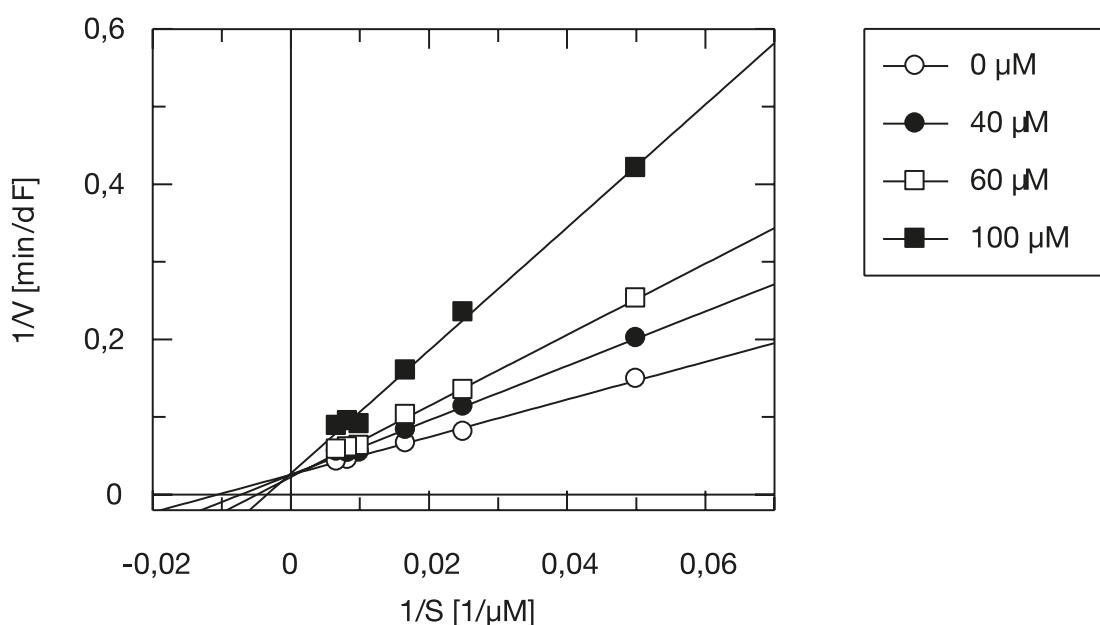


Abbildung 33: TP38. Lineweaver-Burk-Auftragung bei Inhibitor-konzentrationen von 0, 40, 60, 100 μM . Der Schnittpunkt der Geraden liegt auf der y-Achse. Es handelt sich um eine kompetitive Hemmung.

3.3.2 Testung von FM 47 und TP 38 Derivaten

Synthetisierte FM 47 und TP 38 Derivate (31 Substanzen) wurden mittels Inhibitorentestung (2.2.3.6.3.1) untersucht (Tabelle 12, 13). Die Hemmwerte der Substanzen mit Fluoreszenzlöschung („Quenching“) wurden nach einer Korrekturmessung revidiert (2.2.3.6.3.2). Es zeigten 2 Substanzen - HWu 51 und HWu 62 - eine Hemmung von ca. 70 %, dem besten Ergebnis, 2 Substanzen - SH 03

Ergebnisse

und SH 05 - ca. 60 %-Hemmung, 6 Substanzen - HWu 11, HWu 34, HWu 44, SH 01, SH 02, SH 04 - einer Hemmung um die 50 % und 4 Substanzen - HWu 20, HWu 21, HWu 29 und HWu 69 – eine ca. 40 %-ige Hemmung. Die restlichen Derivate zeigten eine Hemmung unter 35%.

Bezeichnung	MW [g/mol]	Konz. [µM]	Hemmung [%]
HWu 3f	385,54	50	29
HWu 4	371,43	50	35
HWu 8	341,45	50	15
HWu 9a	355,48	50	16
HWu 11	402,4	50	54
HWu 12	314,36	50	20
HWu 14	357,41	50	34
HWu 15	316,37	50	29
HWu 17	330,4	50	28
HWu 19	342,41	50	26
HWu 20	407,46	50	41
HWu 21	356,42	50	38
HWu 29	413,47	50	36
HWu 31	371,43	50	34
HWu 34	385,42	50	47
HWu 44	385,42	50	47
HWu 46	443,5	50	30
HWu 47	447,53	50	29
HWu 49	351,38	50	21
HWu 50	365,41	50	3
HWu 51	452,46	50	69
HWu 53	388,41	50	0
HWu 62	475,46	50	66
HWu 63	437,49	50	21
HWu 64	421,49	50	22
HWu 69	452,46	50	38

Tabelle 12: Übersicht der getesteten FM 47 Derivate. Für die *in vivo* Analyse ausgewählte Substanzen sind grau markiert.

Bezeichnung	MW [g/mol]	Konz. [μM]	Hemmung [%]
SH 01	352,43	50	46
SH 02	380,48	50	50
SH 03	394	50	57
SH 04	394,5	50	55
SH 05	380,5	50	61

Tabelle 13: Übersicht der getesteten TP 38 Derivate. Für die *in vivo* Analyse ausgewählte Substanzen sind grau markiert.

3.3.3 Bestimmung des IC_{50} -Wertes ausgewählter Inhibitoren

Für einige der besten *in vitro* getesteten Substanzen wurden die IC_{50} -Werte bestimmt (2.2.3.6.3.3). Um die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch die Fluoreszenzlöschung („Quenching“) des Inhibitors zu berücksichtigen, wurde Korrekturmessung durchgeführt (2.2.3.6.3.2) und die Ergebnisse korrigiert (Abbildung 35, am Beispiel von HWu 62). Die mit GraFit 5 berechnete Steigungen $[\text{dF}/\text{T}]$ der Geraden bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (Abbildung 34, am Beispiel von HWu 62) wurden in relativer Form in Prozent dargestellt. Die Steigung bei $[\text{I}]$ von $0 \mu\text{M}$ diente als Bezugsgröße mit 100 %, da hier die Enzymwirkung ihr Maximum hat. Die Konzentration des Inhibitors, bei der die Steigung nur 50 % betragen hat (IC_{50} 0-100%), wurde mit Hilfe des Programms berechnet (Abbildung 35, am Beispiel des HWu 62).

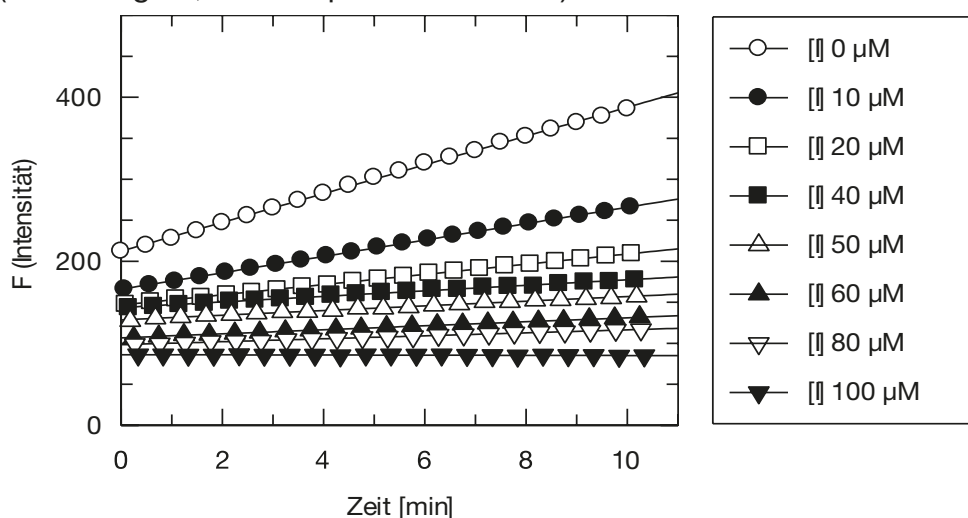


Abbildung 34: HWu 62. Verdünnungsreihe zur IC_{50} -Bestimmung. Messung 1. Auftragung der Intensität gegen Zeit bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

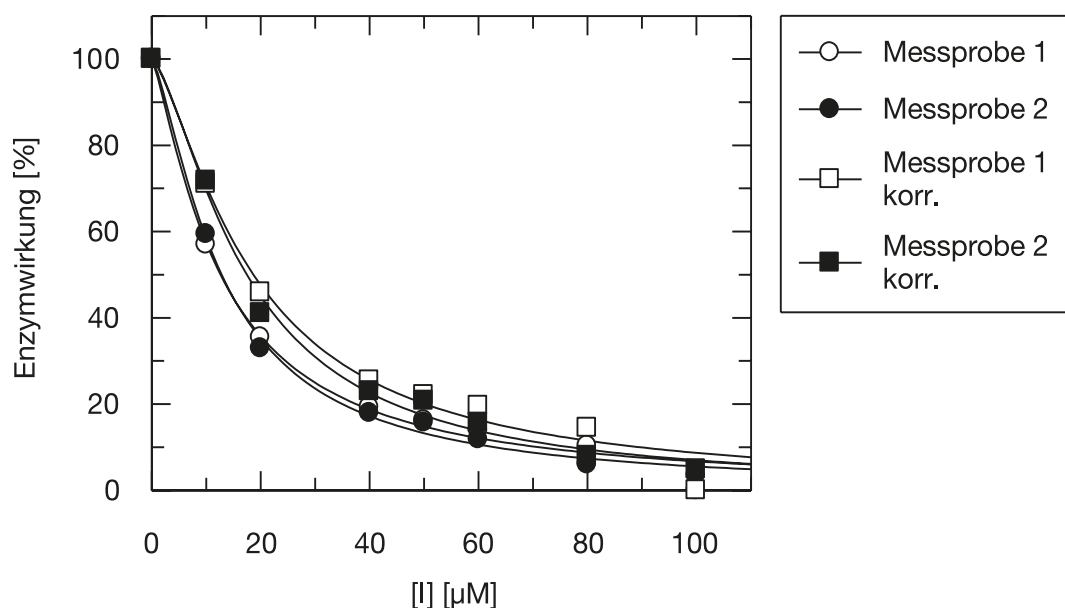


Abbildung 35: HWu 62. Verdünnungsreihe zur IC_{50} -Bestimmung. Enzymwirkung in Prozent in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration in μM bei konstanter Substratkonzentration ($100 \mu\text{M}$) vor (\circ •) und nach Korrektur (\square ■).

Inhibitor	IC_{50} [μM]
HWu 62	18 ± 1
HWu 51	26 ± 2
HWu 44	30 ± 2
HWu 34	53 ± 3
HWu 29	54 ± 6
SH 05	48 ± 5

Tabelle 14: IC_{50} -Werte ausgewählter Inhibitoren unter Angabe der Standardabweichungen

3.3.4 Beurteilung der Wirkungsweise ausgewählter Inhibitoren

Für HWu 62, den wirksamsten der getesteten Inhibitoren *in vitro*, wurden Messreihen zur Beurteilung der Wirkungsweise durchgeführt (2.2.3.6.3.4). Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Substrats so angesetzt, dass die Endkonzentrationen im 200 μl Ansatz 10, 50, 100, 200 μM waren. Da der IC_{50} -Wert von HWu 62 bei $18 \pm 1 \mu\text{M}$ liegt, wurden die Messungen bei niedrigeren Inhibitor-Konzentrationen, als in 2.2.3.6.3.4 beschrieben, durchgeführt. Die Messungen erfolgten als Doppelmessungen bei Inhibitor-Konzentrationen von 0, 5, 10, 20, 40, 60 μM . Mit Hilfe des Programms Graph Pad Prism6 Programm wurden K_m - und V_{max} -

Werte aus beiden Messungen für jede Inhibitorkonzentration berechnet (Tabelle 15). Dabei sah man eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Inhibitorkonzentration, was für eine nichtkompetitive Hemmung des Inhibitors sprechen würde.

HWu 62		
Inhibitor Konz. [μM]	Km [μM]	Vmax [min/dF]
0	68±27	32±5
5	40±15	19±2
10	58±17	19±2
20	174±68	27±6
40	46±26	10±2
60	15±13	5±1

Tabelle 15: HWu 62. Ermittelte Km- und Vmax-Werte bei 0-60 μM

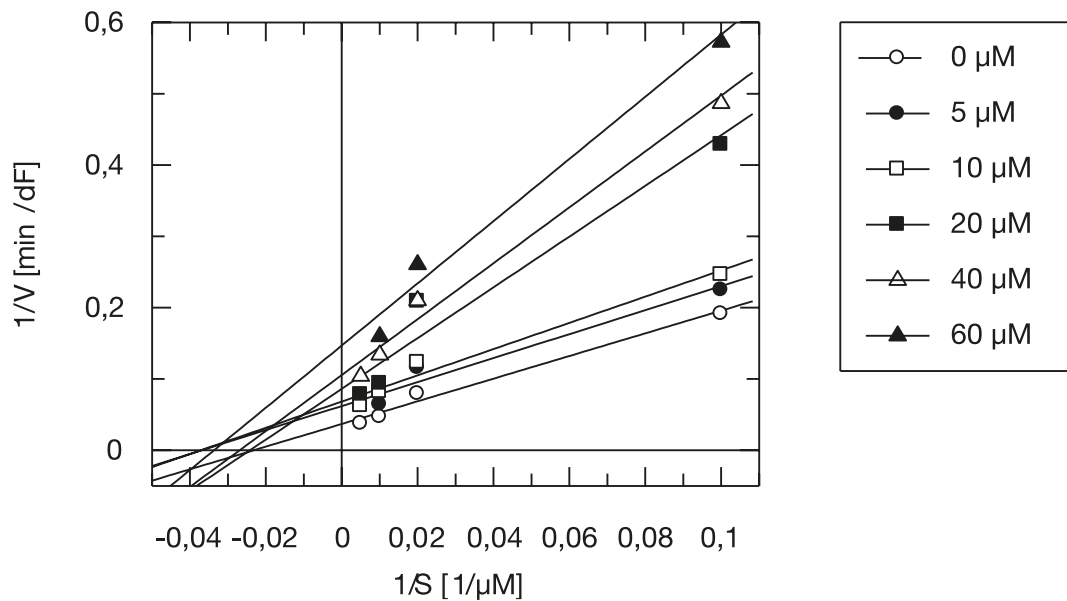


Abbildung 36: HWu 62. Lineweaver-Burk-Auftragung einzelner Messungen bei 0, 5, 10, 20, 40, 60 μM

In der Lineweaver-Burk-Auftragung haben die Geraden nur andeutungsweise einen gemeinsamen Schnittpunkt auf der x-Achse (Abbildung 36). Somit ist die Wirkungsweise nicht eindeutig. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass der Inhibitor mit der einen Bindungsstelle kompetitiv in dem katalytischen Zentrum bindet und mit der anderen nichtkompetitiv außerhalb von diesem.

3.3.5 Analyse ausgewählter FM 47 und TP 38 Derivate *in vivo*

Für die *in vivo* Analyse wurden von den FM 47 und TP 38 Derivaten 9 Inhibitoren mit verschiedenen Hemmeigenschaften *in vitro* ausgesucht: HWu 51 und 62 mit einer Hemmung von 70 %, SH 05 mit 60 %, HWu 11, 34, 44 mit einer Hemmung um die 50 % und HWu 20 und 29 mit einer um die 40% und HWu 50 mit fehlender Hemmwirkung bei 50 μ M (Tabelle 12, 13, grau markiert).

3.3.5.1 Bestimmung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der ausgewählten Inhibitoren wurde, wie in 2.2.3.5.1 beschrieben, bestimmt. Für eine zusätzliche Messung wurden in DMSO gelöste Inhibitoren noch 1:5 mit Medium verdünnt, die Endkonzentrationen im Ansatz blieben die gleichen. Die Verdünnung diente dazu die zytotoxische Wirkung von DMSO zu reduzieren (die DMSO-Konzentration vor der Verdünnung betrug 0,5 %, nach 1:5-Verdünnung nur 0,1 %). Die Auswertung der Messung zeigte annähernd gleiche Ergebnisse für Inhibitorertoxizität, wie in der Messung mit höherem DMSO-Gehalt in den Proben.

Es wurde erkannt, dass die Inhibitoren HWu 11, HWu 51, HWu 62 eine Zytotoxizität im Bereich von 80 bis 5 μ M aufwiesen, dies äußerte sich in der Abnahme der Absorption um bis zu 60 %. Erst ab einer Konzentration von 1,25 μ M waren die Substanzen genauso toxisch wie DMSO. Bei HWu 20, HWu 29, HWu 34 zeigte sich eine Absorptionsabnahme von maximal 30% in Konzentrationen oberhalb 0,5 μ M. HWu 44 war ab 20 μ M und SH 05 ab 5 μ M nicht mehr toxisch. HWu 50 wies keine zytotoxische Wirkung bei den getesteten Konzentrationen auf (Abb. 37-41, Tabelle 16).

Inhibitor	Konzentration [μ M]	Inhibitor	Konzentration [μ M]
HWu 11	1,25	HWu 50	80
HWu 20	0,5	HWu 51	1,25
HWu 29	1,25	HWu 62	1,25
HWu 34	0,5	SH 05	5
HWu 44	20		

Tabelle 16: Zytotoxizitätsmessung ausgewählter Inhibitoren. Inhibitorkonzentrationen bei denen keine Zytotoxizität beobachtet wurde (unter Berücksichtigung zweier Messungen).

Ergebnisse

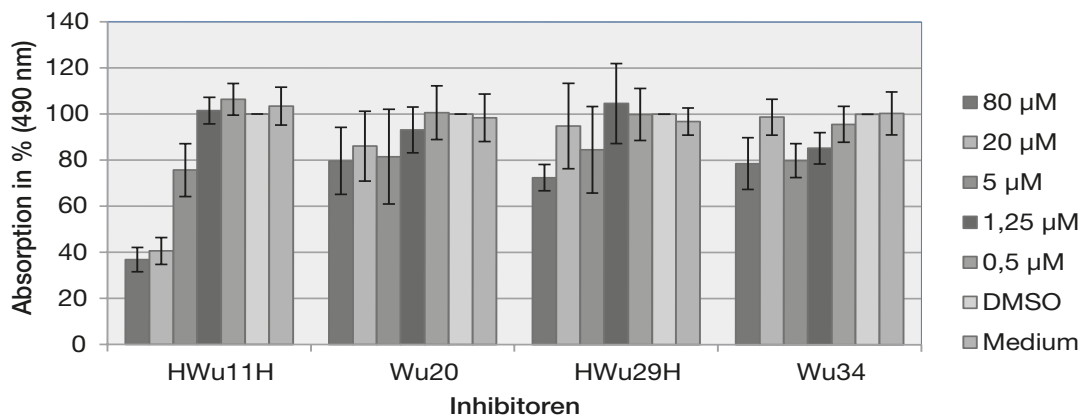


Abbildung 37: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für HWu 11, HWu 20, HWu 29, HWu 34. Darstellung der Absorptionsmittelwerte [%] einer Dreifachmessung bei 80, 20, 5, 1,25 und 0,5 µM Inhibitorkonzentration sowie bei DMSO statt Inhibitor und reinem Medium mit Angabe der Standardabweichung. DMSO-Wert dient als Referenzwert (100%).

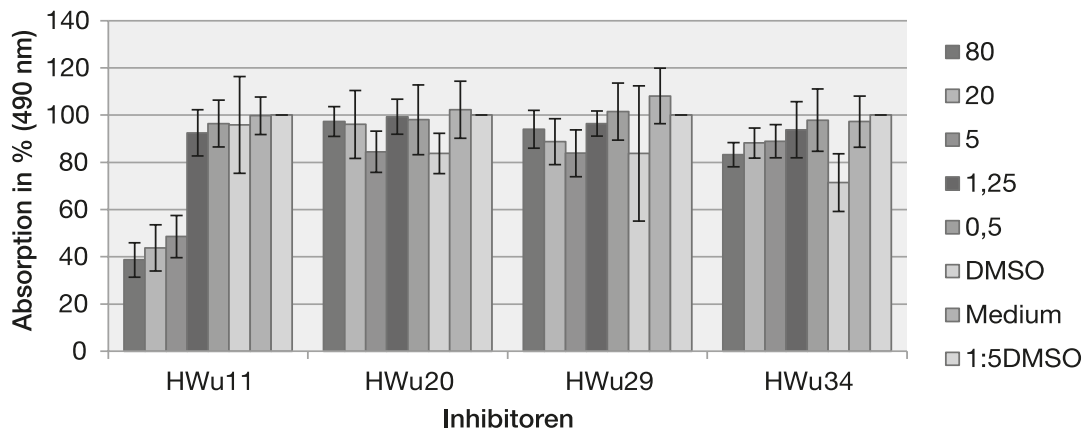
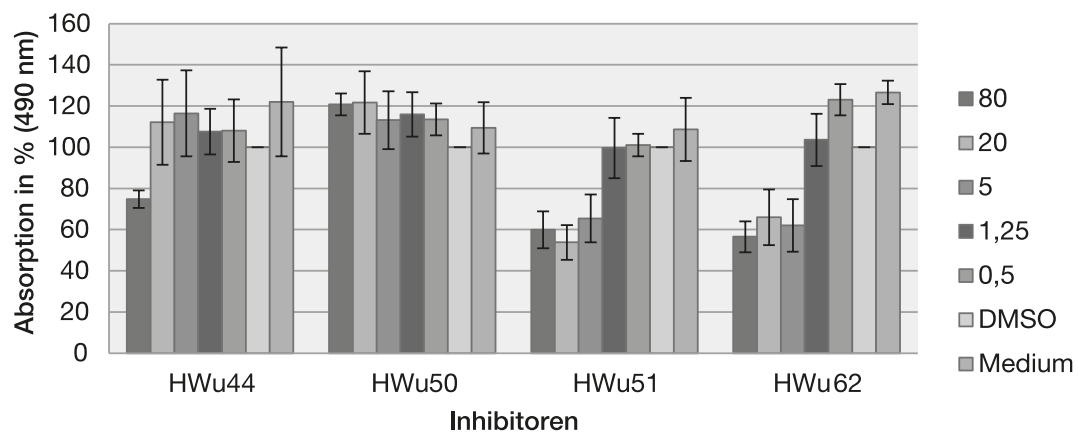


Abbildung 38: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für HWu 11, HWu 20, HWu 29, HWu34 bei verminderter DMSO-Konzentration (1:5 DMSO:Medium). Darstellung der Absorptionsmittelwerte [%] einer Dreifachmessung bei 80, 20, 5, 1,25 und 0,5 µM Inhibitorkonzentration, unverdünntem DMSO statt Inhibitor, reinem Medium sowie 1:5 verdünntem DMSO mit Angabe der Standardabweichung. 1:5 DMSO:Medium-Wert diente als Referenzwert (100%).



Ergebnisse

Abbildung 39: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für HWu 44, HWu 50, HWu 51, HWu 62. Darstellung der Absorptionsmittelwerte [%] einer Dreifachmessung bei 80, 20, 5, 1,25 und 0,5 μM Inhibitorkonzentration sowie bei DMSO statt Inhibitor und reinem Medium mit Angabe der Standardabweichung. DMSO-Wert dient als Referenzwert (100%).

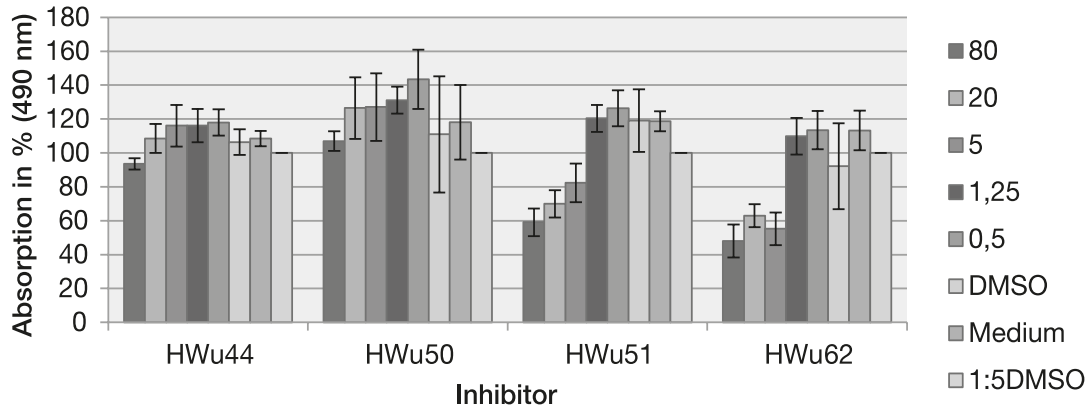


Abbildung 40: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für HWu 44, HWu 50, HWu 51, HWu 62 bei verminderter DMSO-Konzentration (1:5 DMSO:Medium). Darstellung der Absorptionsmittelwerte [%] einer Dreifachmessung bei 80, 20, 5, 1,25 und 0,5 μM Inhibitorkonzentration, unverdünntem DMSO statt Inhibitor, reinem Medium sowie 1:5 verdünntem DMSO mit Angabe der Standardabweichung. 1:5 DMSO:Medium -Wert diente als Referenzwert (100%).

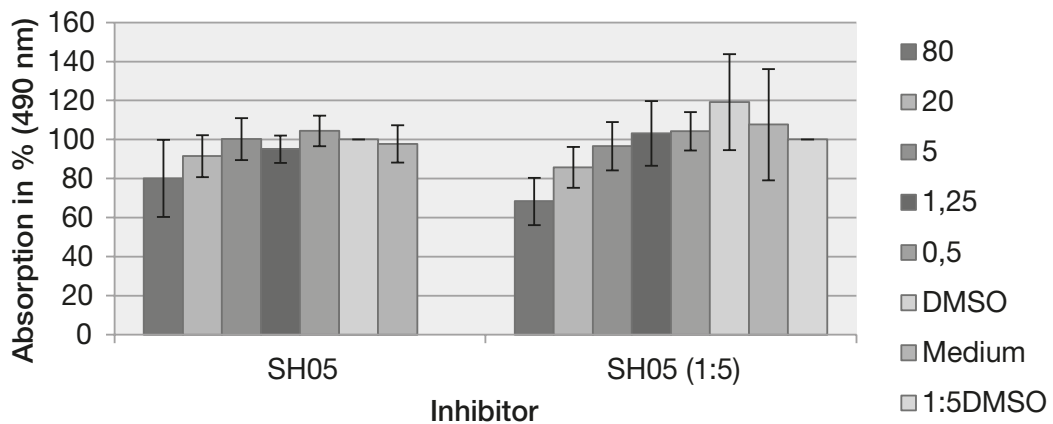


Abbildung 41: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für SH 05. Darstellung der Absorptionsmittelwerte [%] einer Dreifachmessung bei 80, 20, 5, 1,25 und 0,5 μM Inhibitorkonzentration, unverdünntem bzw. 1:5 verdünntem DMSO statt Inhibitor sowie reinem Medium mit Angabe der Standardabweichung. DMSO- bzw. 1:5 DMSO:Medium-Wert diente als Referenzwert (100%).

3.3.5.2. Beurteilung der zytotoxischen Wirkung der DMSO

Die zytotoxische DMSO-Wirkung ist laut Literatur auf eine pH-Veränderung und Anstieg des osmotischen Druckes zurückzuführen (82). Zwar wird DMSO zur-

zeit für Kryokonservierung benutzt und die 10 % Konzentration als untoxisch gilt (83), allerdings gerade in Zellkulturen kann DMSO die Proliferationsrate der Zellen bereits bei Konzentrationen von 1 % um bis zu 50 % reduzieren (84).

Die Ergebnisse der Messungen wurden bezüglich der zytotoxischen Wirkung von DMSO beurteilt (Abbildung 37-41). Dabei wurde 0,5 % DMSO mit Medium und 0,1 % DMSO (1:5) verglichen sowie 0,1 % DMSO (1:5) mit Medium verglichen (Tabelle 17). In der $\frac{2}{3}$ der Fälle war eine Lösung mit höherem DMSO-Gehalt toxischer als mit niedrigerem DMSO-Anteil. In restlichen $\frac{1}{3}$ der Fälle war die Zytotoxizität der beiden ungefähr gleich. Daraus lässt sich schließen, dass DMSO bereits in dieser niedrigen Konzentration leicht zytotoxisch ist. Aus diesem Grund wurden für weitere *in vivo* Tests Inhibitoren 1:1 mit Medium verdünnt.

Ergebnisse von 18 Messungen		Gesamt
DMSO = Medium oder DMSO < Medium	5	11
1:5 DMSO = Medium oder 1:5 DMSO < Medium	2	
DMSO = 1:5 DMSO oder DMSO < 1:5 DMSO	4	
DMSO > Medium	13	25
1:5 DMSO > Medium	7	
DMSO > 1:5 DMSO	5	

Tabelle 17: Beurteilung der Zytotoxischen Wirkung der DMSO. (< weniger toxisch, = gleich toxisch, > stärker toxisch)

3.3.5.3 Beurteilung der Proteaseinhibitoren *in vivo* mit Hilfe von Immunhistochemie und Fluorometrie

Die Hemmung der viralen Replikation durch die 9 ausgewählten FM 47 und TP 38 Derivate wurde in Vero-Zellkultur untersucht. Die maximale DMSO-Konzentration im Ansatz lag bei 0,25 %.

3.3.5.3.1 Visuelle Beurteilung der viralen Replikation

HWu 11, 20, 29, 34, 44, 50, 51, 62, SH 05. Die Wirkung der Proteaseinhibitoren *in vivo* wurde zuerst bei Konzentrationen von 20, 5 und 2,5 μ M getestet und mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie visuell beurteilt (2.2.3.5.2.1). Die infizierten

Ergebnisse

Zellen leuchteten rot, da die viralen Proteine mit Hilfe von Maus-mAb-HB46 als Erst- und anschließend mit fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Anti-Maus-Cy3 als Zweitantikörper markiert wurden. Dabei konnte aus der Menge an rot leuchtenden, infizierten und nicht leuchtenden, nicht infizierten Zellen, auf die Stärke der hemmenden Wirkung geschlossen werden (Tabelle 18).

Konz. [µM]	HWu 11		HWu 20		HWu 29		HWu 34		HWu 44		HWu 50	
20	++	++	+	+	±	±	-	-	±	±	±	±
5	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bedeutung:												
20	++	++	++	++	-	-	++ sehr gute Hemmung + gute Hemmung ± minimale Hemmung - keine Hemmung					
5	++	++	++	++	-	-						
2,5	++	+	++	++	-	-						
Konz. [µM]	HWu 51		HWu 62		SH 05							

Tabelle 18: Visuelle Beurteilung der Inhibitoren HWu 11, 20, 29, 34, 44, 50, 51, 62 und SH 05 bezüglich ihrer Hemmung der viralen Replikation bei Konzentrationen 20, 5, 2,5 µM.

In allen Nöpfchen haben sich die Zellen gleichermaßen vermehrt. In den Nöpfchen mit HWu 62 haben die Zellen bei allen drei Konzentrationen nicht geleuchtet, also konnte sich das DENV2 in Zellen nicht vermehren. Bei HWu 51 und 11 waren vereinzelt leuchtende Zellen bei 2,5 µM nachweisbar und keine Virusvermehrung bei 20 und 5 µM. Da aber gerade die Inhibitoren HWu 11, 51 und 62 eine Zytotoxizität bei den Konzentrationen zwischen 80 und 5 µM aufwiesen, könnte eine generelle Proteinsynthesestörung der Zellen der fehlenden Virusvermehrung zugrunde liegen. So wurden weitere Versuche mit den niedrigeren Inhibitorkonzentrationen zwischen 2,5 µM und 50 nM durchgeführt und die Wirkung durch visuelle Auswertung und mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung quantitativ erfasst.

HWu 20 zeigte gute Hemmung der viralen Replikation nur bei 20 µM, bei dieser Konzentration war es allerdings toxisch (Abbildung 37). HWu 29, 44 waren bei 20 µM nur minimal wirksam. Gleiches gilt für HWu 50, dieser Inhibitor zeigte je-

doch keine Hemmwirkung *in vitro*. In den Nöpfchen mit HWu 34 und SH 05 war keine Hemmung festzustellen.

Aprotinin. Auch die Wirkung von Aprotinin wurde *in vivo* untersucht (Tabelle 19). Für diesen bekannten Dengue-Protease-Inhibitor *in vitro* gibt die Literatur (44) eine 100 %-ige Hemmung der Dengue-NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease bereits bei 0,77 nM und eine minimale Hemmung bei 0,077 nM in der flourometrischen Analyse an. Aus diesem Grund wurde für die *in vivo* Analyse eine Verdünnungsreihe von 0,77 bis 0,077 nM angesetzt. Es wurde keine Hemmung der viralen Replikation bei diesen Aprotininkonzentrationen beobachtet.

Konzentration [nM]	Aprotinin (1,54 µM)		Bedeutung: ++ sehr gute Hemmung + gute Hemmung ± minimale Hemmung - keine Hemmung
0,770	-	-	
0,385	-	-	
0,256	-	-	
0,193	-	-	
0,110	-	-	
0,077	-	-	

Tabelle 19: Visuelle Beurteilung des Aprotinins bezüglich seiner Hemmeigenschaften *in vivo*.

HWu 62, 51, 11. Die Hemmung der viralen Replikation durch HWu 62, 51 und 11 bei Konzentrationen 2,5, 1,0, 0,5, 0,1, 0,05 µM wurde in 2 unabhängigen Versuchen weiter analysiert.

In einer durchsichtigen 96-Napfplatte wurde die Hemmung visuell beurteilt. Dabei wurden die fluoreszierenden Zellnester gezählt und die Ergebnisse in einer Tabelle zusammengefasst (Tabelle 20). Es wurde eine komplette Hemmung der viralen Replikation durch HWu 62 bei 2,5 µM und nur noch geringe bei 1 µM. Die HWu 51 und 11 zeigten nur geringe Hemmwirkung bei 2,5 und keine bei niedrigeren Konzentrationen.

Ergebnisse

	Virusmenge [μ l]			Virusmenge [μ l]			Virusmenge [μ l]		
Inhibitor konz. [μ M]	10	1	0,1	10	1	0,1	10	1	0,1
2,5									
1,0									
0,5									
0,1									
0,05									
	HWu 62			HWu 51			HWu 11		

	Virusmenge [μ l]		
	10	1	0,1
DMSO			

Ohne Virus

Anzahl der leuchtenden Zellnestern: > 100 < 100 > 50 < 50 > 10 0

Tabelle 20 Visuelle Beurteilung der Inhibitoren HWu 11-51-62 bezüglich Hemmung der viralen Replikation bei Konzentrationen 2,5, 1,0, 0,5, 0,1, 0,05 μ M. Farbige Darstellung der Anzahl der infizierten rot leuchtenden Zellnester. Dunkelrot – mehr als 100 Infizierte Zellnester, weiß – keine Infizierten Zellen.

3.3.5.3.2 Fluoreszenzmessung

Um die Hemmung quantitativ zu erfassen, wurde der Versuch bei den Konzentrationen von 2,5 μ M bis 50 nM in einer schwarzen 96-Napfplatte wiederholt. Die Intensität der Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenzspektrometer gemessen (2.2.3.5.2.2).

In folgendem Diagramm ist der Abfall der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Inhibitormenge dargestellt. Der DMSO-Wert diente als oberer Referenzwert, hier sollte die Virusmenge am größten sein. Die Fluoreszenzintensität in 2

Näpfchen ohne Virus diente als unterer Referenzwert (Nullprobe). Bei HWu 62 sah man bei 2,5 μM eine Abnahme der Intensität fast auf den Wert der nicht infizierten Kultur (Abbildung 34). Gleiches wurde bereits in der visuellen Beurteilung festgestellt (Tabelle 20). Auch HWu 51 und 11 zeigten bei der Konzentration eine Abnahme der Fluoreszenzintensität.

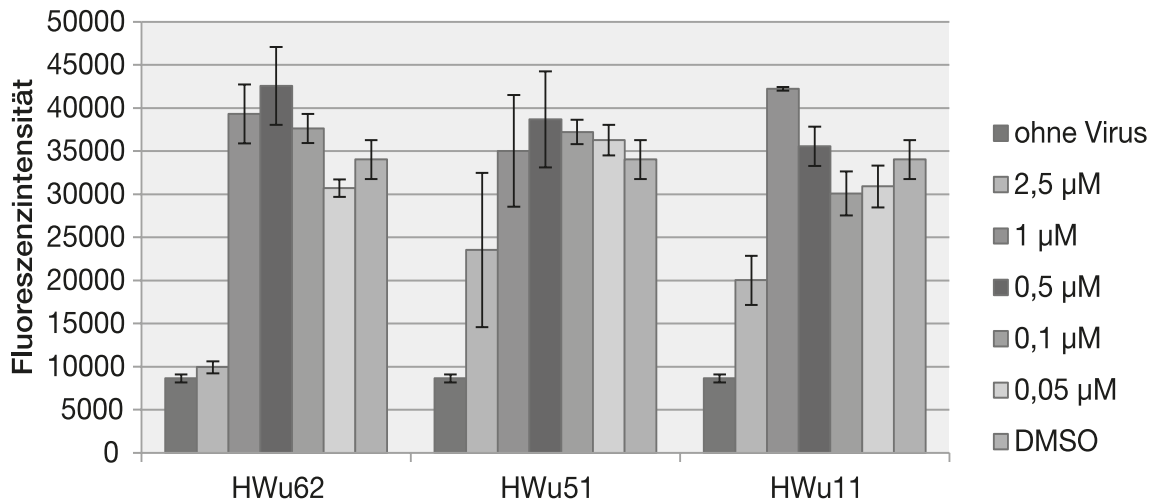


Abbildung 42: Beurteilung der Hemmwirkung von HWu 62-51-11 mittels Fluoreszenzspektrometrie. Der erste Balken zeigt den Mittelwert der Fluoreszenzintensität in 2 Näpfchen ohne Virus, der letzte in den Näpfchen mit 10 μl Virussuspension aber ohne Inhibitor (Nullprobe), die mittleren Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Rechnet man die Messergebnisse in Prozent um, so sieht man eine fast komplette Hemmung bei 2,5 μM bei HWu 62, ca. 50 %-ige Hemmung bei 2,5 μM bei HWu 11 und ca. 40 %-ige Hemmung bei gleicher Konzentration bei HWu 51. In der Toxizitätsmessung waren alle drei Substanzen toxisch bei 5 μM und erst ab einer Konzentration von 1,25 μM lagen sie außerhalb des toxischen Bereiches (Abbildung 41-45). Konzentrationen zwischen 5 und 1,25 μM wurden nicht untersucht.

Die Inhibitoren FM 47, HWu 62 und 51 wurden nach Fertigstellung dieser Arbeit erneut *in vivo* untersucht. Es wurde eine gute Hemmung der DENV2 und zusätzlich der DENV3 Replikation bestätigt.

Zwei gute Inhibitoren *in vitro* SH 05 und HWu 34 zeigten in der Zellkultur keine Wirkung. Ursächlich kann einerseits eine deutlich niedrigere Inhibitorkonzentration als im *in vitro* Test sein, die unzureichend für die Hemmung der viralen Vermehrung war. Andererseits kann es sein, dass die Substanzen aus irgendeinem

Ergebnisse

Grund nicht in die Zelle gelangen können oder in der Zelle verstoffwechselt und in eine unwirksame Form umgewandelt werden.

Der Inhibitor HWu 50, der *in vitro* unwirksam war zeigte dagegen minimale Hemmung bei 20 µM in der Zellkultur, das war auch der einzige nicht toxische Inhibitor der Gruppe. Ursächlich für die inhibitorische Wirkung könnte eine andere Wirkungsweise als die Proteasehemmung sein.

Inhibitor	Hemmung [%] bei 50 µM	IC ₅₀ [µM]	Keine Toxizität ab [µM]	<u>Zellkultur-Test 1</u> Hemmung bei 20-5-2,5 µM (visuelle Beurteilung)	<u>Zellkultur-Test 2</u> Hemmung bei 2,5-1-0,5-0,1-0,05 µM (visuelle Beurteilung)	<u>Zellkultur-Test 3</u> Hemmung bei 2,5-1-0,5-0,1-0,05 µM in Prozent (fluorometrische Messung)
HWu 11	54	n.b.	1,25	gut bei 2,5 µM sehr gut bei 5 µM	minimal bei 2,5 µM	50 % bei 2,5 µM keine bei 1 µM
HWu 20	41	n.b.	0,5	gut bei 20 µM	n.b.	n.b.
HWu 29	36	54±6	0,5	minimal bei 20µM	n.b.	n.b.
HWu 34	47	53±3	0,5	keine	n.b.	n.b.
HWu 44	47	30±2	20	minimal bei 20µM	n.b.	n.b.
HWu 50	3	n.b.	80	minimal bei 20µM	n.b.	n.b.
HWu 51	69	26±2	1,25	sehr gut bei 2,5µM	mäßig bei 2,5 µM	40 % bei 2,5 µM keine bei 1 µM
HWu 62	66	18±1	1,25	sehr gut bei 2,5µM	sehr gut bei 2,5 µM minimal bei 1 µM	95 % bei 2,5 µM keine bei 1 µM
SH 05	61	48±5	5	keine	n.b.	n.b.

Tabelle 21: Zusammenfassung der *in vitro* und *in vivo* Analysen ausgewählter Inhibitoren (n.b.; wurde nicht bestimmt)

Während der *in vitro* Tests der Inhibitoren wurden einige Substanzen mit sehr guten Hemmeigenschaften identifiziert und *in vivo* weiteruntersucht. Einige von ihnen wurden als potente PIs *in vivo* identifiziert und könnten als Nächstes im Tierversuch getestet werden. Somit ist ein Ausgangspunkt für weitere Synthesversuche gesetzt.

4. Diskussion

4.1 Entwicklung antiviraler Substanzen

Momentan ist die Therapie von DF, DHF, DSS rein symptomatisch, da noch keine wirksamen Medikamente oder Vakzine gegen Denguevirus-Infektion entwickelt worden sind (52). Die Existenz von vier Dengue-Serotypen erschwert diese Aufgabe. Dennoch ist die Entwicklung von Proteaseinhibitoren vielversprechend, um Substanzen zu finden, die bei allen vier gleichermaßen wirksam sind. Zwar weisen die NS3-Proteasen-Untereinheiten der vier Dengue Serotypen nur eine 60 %-ige Strukturähnlichkeit auf, doch sind ihre Substratpräferenzen fast identisch (53).

In der HIV-1 Therapie brachte die klinische Einführung der PIs den großen Durchbruch und verlängerte die Lebenszeit der Patienten erheblich (85-87). Die HIV-Therapie wurde ständig fortentwickelt, so dass heute potente Substanzen zur Verfügung stehen, die auch bei resistenten Viren wirken (88-91). Auch in der HCV gelang es durch Einführung der PIs Telaprevir, Boceprevir und Simeprevir das HCV Typ 1 vollständig zu eliminieren (92-98). PIs stellen gegen Retroviren und Flaviviren potente antivirale Substanzen dar.

Da gerade die höheren Virustiter mit einem schwereren Krankheitsverlauf einhergehen (99-102), könnte der Einsatz von PIs die Virusvermehrung unterdrücken, Virämie vermindern und den Übergang der Erkrankung in die kritische Phase verhindern. Außerdem würde die Reduktion des Virustiters und der Virämiezeit die Wahrscheinlichkeit der Virustransmission verringern und so die weitere Ausbreitung der Dengueinfektion in den Endemiegebieten vermindern und/oder verlangsamen.

4.2 Methoden zur Entwicklung antiviraler Substanzen

Bei der Entwicklung neuer antiviraler Substanzen kann generell zwischen verschiedenen Herangehensweisen unterschieden werden. Meist werden große Substanzbibliotheken in *in vitro* Testsystemen im Hochdurchsatzverfahren

untersucht und wirksame Stoffe weiter analysiert. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit automatisiert große Substanzbibliotheken (>10000 Stoffe) schnell untersuchen zu können. Sein Nachteil liegt in der großen Zahl an falsch positiven Substanzen und im relativ hohen finanziellen und zeitlichen Aufwand. Eine andere Herangehensweise ist die Untersuchung von Stoffgemischen wie z.B. Naturstoffe und die anschließende Isolierung der aktiven Wirkstoffe. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit schnell mehrere Komponente testen zu können, während der Nachteil in der z.T. hohen Toxizität der Gemische, der vielleicht zu niedrigen Konzentration des Wirkstoffes und dessen schwieriger Isolation besteht (104).

Eine zielgerichtete Medikamentenentwicklung stellt das sog. „rationale Medikamentendesign“ dar. Dabei werden Wirkstoffe gezielt gegen virale Moleküle entwickelt, indem z.B. Wirkstoffe an Röntgenstrukturen viraler Enzyme moduliert werden. Dieses Verfahren wurde bei der Entwicklung von HIV-1 PIs (105), aber auch beim Thyrisinkinaseinhibitor Imatinib, der in der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie erfolgreich angewendet wird (106, 107), verwendet. Eine Voraussetzung ist jedoch, dass der Bindungsmodus und die kristallographische Struktur des Enzyms bekannt sind. Bei allen Verfahren ist die separate Bestimmung der Zelltoxizität und der Nachweis der Inhibition der Virusreplikation nötig.

In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus Suche nach Dengue PIs in der Substanzbibliothek und aus der Fortentwicklung dieser durch rationales molekulares „Docking“ verwendet. Nach der Entwicklung eines *in vitro* Proteasetests wurde eine Bibliothek untersucht und wirksame Substanzen (FM47, TP38) isoliert. Diese wurde charakterisiert und eine nicht-kompetitive Inhibition gezeigt. Anschließend wurde FM47 durch die Arbeitsgruppen Schirmeister (Institut für Pharmazie und Biochemie Uni Mainz) und Engels (Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Uni Würzburg) molekular an die Struktur der DENV PR „gedockt“. Bisher sind nur die räumlichen DENV2 Strukturen der NS3pro und NS2B-Gly-Linker-NS3pro-PR kristallographisch gelöst worden (17, 44). Es besteht allerdings die Möglichkeit die DENV3-Protease für „Molecular Docking“ zu nutzen, da die kristallographische Struktur dieser Protease im Komplex mit

einem Aldehyd Inhibitor vorhanden ist und die Proteasen beider Dengue-Serotypen weitgehend ähnlich sind (108). Die an den Strukturen fortentwickelten Substanzen wurden iterativ weiter getestet.

Die Derivate HWu 62, 51 und 11 führten zu einer starken Hemmung der DENV2 PR und der Virusreplikation. Weiterhin sind diese Substanzen, wie nach dem Computersimulation zu erwarten, auch gegen die DENV3 PR aktiv. Dies untermauert das Docking-Model.

Manche *in vitro* wirksamen PIs zeigten keine Hemmung der Virusreplikation, wie z.B. TP38-Derivat SH 05. Es ist wahrscheinlich, dass diese Substanzen nicht in die Zelle gelangen können oder in der Zelle verstoffwechselt und in eine unwirksame Form umgewandelt werden. Auf jeden Fall sind die gefundenen Substanzen besser als alle bisher publizierten DENV PIs.

4.3 Prozessierung des Vorläuferproteins

Die Schnittstellensequenzen von DENV sind weniger streng definiert als bei anderen Viren. Es zeigt sich jedoch, dass die Sequenz RR (Arginin-Arginin) oder KR (Lysin-Arginin) an den Positionen P2 und P1 konserviert sind, während kleine Aminosäuren an P1 den Schnitt begünstigen (50, 51, 109, 110). Generell gilt für Viren, dass die virale Proteasen sich im ersten Schritt selbst prozessieren und dadurch aktivieren. Dies wurde vor allem bei HIV-1 untersucht (111, 112). Anschließend werden die Vorläuferproteine in festgelegter zeitlicher Reihenfolge prozessiert. Diese wird durch die Prozessivität der jeweiligen Schnittstellen determiniert (113). Im *in vitro* Proteasetest wurde die optimale NS2-NS3 Schnittstelle getestet (75). Dies kann die effizientere Hemmung der Replikation durch die PIs als im Fall der direkten Hemmung im Proteasetest erklären, da für die virale Replikation alle, also auch suboptimale Proteaseschnittstellen prozessiert werden müssen.

Die nicht-kompetitive Hemmung unterscheidet die hier beschriebenen PIs von den kompetitiven PIs die gegen die HIV-1-Protease eingesetzt werden. Die nicht-kompetitive Hemmung hat zwei grundlegende Vorteile: 1. Der nicht kompetitive Inhibitor konkurriert nicht mit dem Substrat um die Bindungsstelle, d.h.

es wird weniger PI für eine Hemmung benötigt. 2. Das Virus kann nicht durch Mutationen in den Schnittstellen dem Selektionsdruck der PIs ausweichen (114).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit beschriebenen PIs mit ihrer hohen Wirksamkeit vielversprechende Kandidaten für die weitere Medikamentenentwicklung darstellen. So wurde nach Fertigstellung dieser Arbeit gezeigt, dass die hier beschriebenen Substanzen spezifisch die DENV 2 und 3 PR in der Zelle hemmen und auch nicht die HIV-1 Replikation beeinflussen. Als nächsten Schritt sollen die Substanzen im Tierversuch getestet werden.

5. Zusammenfassung

Weltweit leben ca. 2,5 Mrd. Menschen im Dengue Virus Verbreitungsgebiet. Dengue Virus Infektionen führen zum Dengue Fieber und können bei Re-Infektionen mit anderen Serotypen das sog. Dengue Schocksyndrom mit einer Letalität von 10% verursachen. Momentan stehen jedoch weder Impfstoffe noch antivirale Substanzen zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit sollten DENV2-Proteaseinhibitoren entwickelt werden. Dazu wurde ein *in vitro* DENV Proteasetest etabliert, für den die DENV Protease in Bakterien exprimiert und anschließend gereinigt wurde. Mit diesem System wurden 144 Verbindungen getestet und Diaryl-Thioether, Thiazole und Zimtsäurederivate als Dengue PIs charakterisiert. Ein Diarylthioether (FM 47) wurde an die Proteasestruktur modelliert und nach den Strukturdaten zielgerichtet derivatisiert. Diese Derivate inhibierten die Protease im mikromolaren Bereich und wurden anschließend in einer Zellkultur getestet. Drei Substanzen - HWu 11, HWu 51, HWu 62 - zeigten gute bis sehr gute Hemmung *in vivo* bei 2,5 μ M. Die Charakterisierung der Inhibitoren zeigte eine nicht-kompetitive Hemmung. Die gefundenen Substanzen bilden eine gute Grundlage für die weitere Inhibitorforschung.

6. Literaturverzeichnis

1. Eliana G. Acosta, Viviana Castilla and Elsa B. Damonte. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cellular Microbiology*. 2009, 11.
2. WHO. Dengue – Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control (en). A joint publication of the World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). 2009.
3. Brett D. Lindenbach, Heinz-Jurgen Thiel, Charles M. Rice. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. [Buchverf.] D. M. Knipe and P. M. Howley. *Fields Virology*, 5th Edition. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 2007.
4. WHO. media centre fact sheet N°117. November 2012.
5. Kim Knowlton, Gina Solomon, Miriam Rotkin-Ellman. “Fever Pitch: Mosquito-Borne Dengue Fever Threat Spreading in the Americas”. NRDC Issue Paper. July 2009.
6. (2010), World Health Organization - Regional Office for South East Asia. Situation update of dengue in the SEA Region, 2010.
7. WHO. The First WHO Report on Neglected Tropical Diseases: Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. 2010.
8. Region, WHO Western Pacific. WPRO Dengue Situation Updates as of 25 December 2013. 2013.
9. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*. 1995 Apr-Jun;1:55-7.
10. William B. Messer, Duane J. Gubler, Eva Harris, Kamalanayani Sivananthan and Aravinda M. de Silva. Emergence and Global Spread of a Dengue Serotype 3, Subtype III Virus. *EID Journal*. Volume 9. 2003.
11. Ananda Amarasinghe Comments to Author, Joel N. Kuritsky, G. William Letson, and Harold S. Margolis. Dengue Virus Infection in Africa. *Emerging Infectious Diseases (CDC)*. Volume 17, Number 8, August 2011.
12. http://www.nathnac.org/pro/clinical_updates/images/dengue_2011.JPG.
13. Maria Glória Teixeira, João Bosco Siqueira, Germano L. C. Ferreira, Lucia Bricks and Graham Joint. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000–2010): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*.

7: e2520, 2013 December.

14. Teixeira, Maria Glória, et al., et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cad. Saúde Pública* vol.25 supl.1 Rio de Janeiro 2009.

15. Reiter, Paul. „Yellow fever and dengue: a threat to Europe?“. *Eurosurveillance*. 11 March 2010, Bd. 15, Issue 10.

16. Nor Azila Muhammad Azami, Sharifah Azura Salleh, Hui-min Neoh, Syed Zulkifli Syed Zakaria. „Dengue epidemic in Malaysia: Not a predominantly urban disease anymore“. *BMC Research Notes*. 2011.

17. Sonia Melino, Maurizio Paci. „Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach“. *The FEBS Journal*. 2007.

18. Debarati Guha-Sapir, Barbara Schimmer. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerging Themes in Epidemiology*. March 2005.

19. (CDC), Centers for Disease Control and Prevention. “International Notes Dengue Epidemic -- Ecuador, 1988”. 38;419-421, 1989, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001411.htm>.

20. Gubler, Duane J. Epidemic Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: A Global Public Health Problem in the 21st Century*. *Dengue Bulletin – Vol 21*. 1997.

21. RKI. “Reiseassoziiertes Dengue-Fieber in Deutschland 2001–2006”. *Epidemiologisches Bulletin*. 6. Juli 2007, Nr. 27.

22. Roberto Romi, Luciano Toma, Francesco Severini, Marco Di Luca. „Twenty Years of the Presence of *Aedes albopictus* in Italy – From the Annoying Pest Mosquito to the Real Disease Vector“. *European Infectious Disease*. 2008, 2:98-101.

23. RKI. „Reiseassoziierte Infektionskrankheiten 2009“. *Epidemiologisches Bulletin*. 27. September 2010, Nr. 38.

24. J Schmidt-Chanasit, M Haditsch, I Schöneberg, S Günther, K Stark, C Frank. “Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany“. *Eurosurveillance*. 07 October 2010, Bd. 15, Issue 40.

25. Vinod Joshi, D.t. Mourya, R.C. Sharma. “Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generation of *Aedes aegypti* mosquitoes”. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002, 67: 158–161.

26. al, Nguyet Minh Nguyen et. Host and viral features of human dengue cas-

es shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. PNAS. May 28, 2013 vol. 110 no. 22 .

27. Wilson, Lin H. Chen and Mary E. "Non-Vector Transmission of Dengue and Other Mosquito-Borne Flaviviruses". Dengue Bulletins. 2005, Bd. 29 , CHAPTER03.

28. Phongsamart, Wanatpreeya MD, Yoksan, Sutee MD, PhD†, Vanaprapa, Nirun MD, Chokephaibulkit, Kulkanya MD. "Dengue Virus Infection in Late Pregnancy and Transmission to the Infants". The Pediatric Infectious Disease Journal. June 2008, Bde. 27: 500-504.

29. Pouliot SH, Xiong X, Harville E, Paz-Soldan V, Tomashek KM, Breart G, Buekens P. "Maternal dengue and pregnancy outcomes: a systematic review". Obstet Gynecol Surv. 65:107-18, Feb 2010.

30. Basurko C, Carles G, Youssef M, Guindi WE. "Maternal and fetal consequences of dengue fever during pregnancy". Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. Nov 2009, 147:29-32.

31. Peng Chiong Tan, May Zaw Soe, Khaing Si Lay, Seok Mui Wang, Shamala Devi Sekaran, Siti Zawiah Omar. "Dengue Infection and Miscarriage: A Prospective Case Control Study". PLoS Negl Trop Dis. May 2012, 6: e1637.

32. Ishag Adam, Ammar M Jumaa, Hagir M Elbashir, Mubarak S Karsany. "Maternal and perinatal outcomes of dengue in PortSudan, Eastern Sudan". Virol J. 2010, 7: 153.

33. MA, Tolle. „Mosquito-borne diseases“. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 39, April 2009, Nr.4: 97–140.

34. RKI. „Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten“. 2011.

35. CDC. Laboratory Guidance and Diagnostic Testing. 2010.

36. WHO. "Dengue haemorrhagic fever diagnosis, treatment, prevention and control". 2nd edition. Geneva, 1997, Chapter 3, Treatment.

37. Hope H. Biswas, Oscar Ortega, Aubree Gordon, Katherine Standish, Angel Balmaseda, Guillermina Kuan, Eva Harris. Early Clinical Features of Dengue Virus Infection in Nicaraguan Children: A Longitudinal Analysis. PLoS Negl Trop Dis 6. 2012.

38. Bridget A. Wills, Emmanuelle E. Oragui, Alick C. Stephens, Olufunmilayo A. Daramola, Nguyen Minh Dung, Ha Thi Loan, Nguyen Vinh Chau, Mary Cham-

- bers, Kasia Stepniewska, Jeremy J. Farrar and Michael Levin. Coagulation Abnormalities in Dengue Hemorrhagic Fever: Serial Investigations in 167 Vietnamese Children with Dengue Shock Syndrome. *Clinical Infectious Diseases* 35. 2002.
39. WHO. "Dengue haemorrhagic fever diagnosis, treatment, prevention and control". 2nd edition, 1997, Chapter 3, Treatment.
40. Nitipong Permpalung, Panyavee Pitisuttithum, Pattama Torvorapanit, Piyabuth Kittithamvongs, Usa Thisyakorn. Initial fluid resuscitation for children with dengue shock syndrome: a systematic review. *Asian Biomedicine* Vol. 3 No. 6, p. 579-588. December 2009.
41. Takol Chareonsirisuthigul, Siripen Kalayanarooj and Sukathida Ubol. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *Journal of General Virology* 88, p. 365–375. 2007.
42. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* 158, p. 1445-59. 2013.
43. Soni A, Chugh K, Sachdev A, Gupta D. Management of dengue fever in ICU. *Indian J Pediatr.* 68: p. 1051-5. 2001.
44. Donmienne Leung, Kate Schroder, Helen White, Ning-Xia Fang, Martin J. Stoermer. „Activity of Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Protease in the Presence of a Truncated NS2B Co-factor, Small Peptide Substrates, and Inhibitors“. *The Journal of Biological Chemistry.* 2001, Bd. 276, No. 49: 45762–45771.
45. S. M. Tomlinson, R. D. Malmstrom and S. J. Watowich. "New Approaches to Structure-Based Discovery of Dengue Protease Inhibitors" *Infectious Disorders - Drug Targets* 2009, 9, 327-343. *Infectious Disorders - Drug Targets.* 2009, 9: 327-343.
46. Michael G. Jacobs, Peter J. Robinson, Cheryl Bletchly, Jason M. Mackenzie and Paul R. Young. "Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction". *FASEB J.* Aug. 2000, 14:1603-10.

47. Breno M. Silva, Lirlândia P. Sousa, Alessandra C. Gomes-Ruiz, Flávia G. G. Leite, Mauro M. Teixeira, Flávio G. da Fonseca, Paulo F. P. Pimenta, Paulo C. P. Ferreira, Erna G. Kroon und Cláudio A. Bonjardim. "The dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) increases NF- κ B transcriptional activity in HepG2 cells". *Arch Virol.* Jul. 2011, 156:1275-1279.
48. Tracy L. Arakakia, Ning-Xia Fangb, David P. Fairliea, Paul R. Youngb and Jennifer L. Martin. *Protein Expression & Purification* „Catalytically active Dengue virus NS3 protease forms aggregates that are separable by size exclusion chromatography“. *Protein Expr Purif.* Jul. 2002, 25:241-7.
49. Löfler, Petrides, Heinrich. „Biochemie & Pathobiochemie“. 8. Auflage: 120-121.
50. Falgout, Rosaura P. C. Valle and Barry. "Mutagenesis of the NS3 Protease of Dengue Virus Type 2". *Journal of Virology* Jan. 1998, Bd. 72, No. 1: 624–632.
51. Pornwaratt Niyomrattanakit, Sviatlana Yahorava, Ilze Mutule, Felikss Mutulis, Ramona Petrovska, Peteris Prusis, Gerd Katzenmeier, Jarl E. S. Wikberg. *Biochem. J.* (2006) 397, 203–211 "Probing the substrate specificity of the dengue virus type 2 NS3 serine protease by using internally quenched fluorescent peptides". *Biochem. J.* 2006, 397: 203–211.
52. Konishi, Eiji. "Issues Related to Recent Dengue Vaccine Development". *Tropical Medicine and Health.* 2011, Bd. 39, No. 4 Supplement: 63-71.
53. Jun Li, Siew Pheng Lim, David Beer, Viral Patel, Daying Wen, Christine Tumanut, David C. Tully, Jennifer A. Williams, Jan Jiricek, John P. Priestle, Jennifer L. Harris and Subhash G. Vasudevan. "Functional Profiling of Recombinant NS3 Proteases from All Four Serotypes of Dengue Virus Using Tetrapeptide and Octapeptide Substrate Libraries". *The Journal of Biological Chemistry.* 2005, Bd. 280, No. 31, Issue of August 5: 28766–28774.
54. Webster, A. M. Mahdy and N. R. "Perioperative systemic haemostatic agents". *British Journal of Anaesthesia.* 2004, 93: 842–58.
55. European Medicines Agency. "European Medicines Agency recommends lifting suspension of aprotinin". 17/02/2012, Press release.
56. Lisa K. Vande Vusse, Leo R. Zacharski, Maura G. Dumas, Laurel J. McKernan, Cornelius J. Cornell, Erron A. Kinsler, James L. Whiteside. "Prohemostatic Therapy: The Rise and Fall of Aprotinin" . *Semin Thromb Hemost.* 2010, 36:

103-112 .

57. Zheng Yin, Sejal J.Patel, Wei-Ling Wang, Gang Wang, Wai-Ling Chan, K.R. Randa Rao, Jenefer Alam, Duraiswamy A. Jeyaraj, Xinyi Ngew, Viral Patel, David Beer, Siew Pheng Lim, Subhash G. Vasudevan and Thomas H. Keller. „Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead“. *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters*. Jan. 2006, 16 36-39.
58. Zheng Yin, Sejal J.Patel, Wei-Ling Wang, Gang Wang, Wai-Ling Chan, K.R. Randa Rao, Jenefer Alam, Duraiswamy A. Jeyaraj, Xinyi Ngew, Viral Patel, David Beer, Siew Pheng Lim, Subhash G. Vasudevan and Thomas H. Keller. „Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors“. *Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters*. Jan. 2006, 16:40-43.
59. Chi-Chen Yang, Yi-Chen Hsieh, Shioh-Ju Lee, Szu-Huei Wu, Ching-Len Liao, Chang-Huei Tsao, Yu-Sheng Chao, Jyh-Haur Chern, Chung-Pu Wu and Andrew Yueh. „Novel Dengue Virus-Specific NS2B/NS3 Protease Inhibitor, BP2109, Discovered by a High-Throughput Screening Assay“. *Antimicrob Agents Chemother*. Jan 2011, 55: 229-38.
60. Zheng Yin, Yen-Liang Chen, Wouter Schu, Qing-Yin Wang, Feng Gu, Jeyaraj Duraiswamy, Ravinder Reddy Kondreddi. „An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus“. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dez. 2009, 106: 20435–20439.
61. Marijke M. F. Alen, Dominique Schols. “Dengue Virus Entry as Target for Antiviral Therapy”. *Journal of Tropical Medicine*. 2012: 628475.
62. Min Qing, Feng Yang, Bo Zhang, Gang Zou, John M. Robida, Zhiming Yuan. „Cyclosporine Inhibits Flavivirus Replication through Blocking the Interaction between Host Cyclophilins and Viral NS5 Protein“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapie*. Aug. 2009, Bd. 53, No. 8: 3226–3235.
63. Mülhardt, Cornel. *Molekularbiologie/ Genomics*, S. 42-44. Der Experimentator. 6. Auflage 2009.
64. Monika Jansohn, Achim Aigner. *Gentechnische Methoden eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. München : Spektrum, Akad. Verl., 2012. 978-3-8274-2429-7 , 978-3-8274-2430-3 .
65. Firma QIAGEN, The QIAexpressionist™. “A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins”, S.18. Juni 2003 : s.n.
66. GeneON. GeneON Homepage http://www.taq-dna.com/iptg_300.html.

67. F.Horn. Biochemie des Menschen; Das Lehrbuch für Mediziner; S.58-59. 3. Auflage 2005.
68. Löffler, Petrides, Heinrich. „Biochemie & Pathobiochemie“ 8. Auflage S.121-126.
69. Bisswanger, Hans. Enzyme Kinetics, S. 75-77. s.l. : WILEY-VCH, 2008. 978-3-527-31957-2.
70. Bisswanger, Hans. Practical Enzymologie, S. 33-39. s.l. : WILEY-BLACKWELL, 2011. 978-3-527-32076-9.
71. Richard R. Neubig, Michael Spedding, Terry Kenakin and Arthur Christopoulos. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. Pharmacological Reviews. Volume 55, No 4, P. 597–606, 2003.
72. Steuer C, Heinonen KH, Kattner L, Klein CD. „Optimization of assay conditions for dengue virus protease: effect of various polyols and nonionic detergents“. J Biomol Screen. Oct. 2009, 14: 1102-1108.
73. Holtzhauer, Martin. Methoden in der Proteinanalytik, S. 125-126. s.l. : Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1996. ISBN 3-540-60210-0.
74. Prof. Dr. Hans-Peter Kleber, Prof. Dr. Dieter Schlee. Biochemisches Praktikum, S. 83-86. Jena : Gustav Fischer Verlag, 1997. ISBN 3-437-35020-X.
75. Rohana Yusof, Stephen Clum, Mary Wetzel, H. M. Krishna Murthy, and R. Padmanabhan. Purified NS2B/NS3 Serine Protease of Dengue Virus Type 2 Exhibits Cofactor NS2B Dependence for Cleavage of Substrates with Dibasic Amino Acids in Vitro. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 275, No. 14, pp. 9963–9969, 2000.
76. Opas Choksupmanee, Kenneth Hodge, Gerd Katzenmeier, Sarin Chimnaronk. Structural Platform for the Autolytic Activity of an Intact NS2B–NS3 Protease Complex from Dengue Virus. Biochemistry. 2012, 51: 2840-51.
77. Rabuesak Khumthong, Chanan Angsuthanasombat, Sakol Panyim and Gerd Katzenmeier. In Vitro Determination of Dengue Virus Type 2 NS2B-NS3 Protease. Activity with Fluorescent Peptide Substrates. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 35, pp. 206-212, March 2001.
78. Nall TA, Chappell KJ, Stoermer MJ, Fang NX, Tyndall JD, Young PR, Fairlie

- DP. "Enzymatic Characterization and Homology Model of a Catalytically Active Recombinant West Nile Virus NS3 Protease". *J Biol Chem*. Nov. 2004, 279(47): 48535-42.
79. Stephen Clum, Kurt E. Ebner, R. Padmanabhan. Cotranslational Membrane Insertion of the Serine Proteinase Precursor NS2B-NS3(Pro) of Dengue Virus Type 2 Is Required for Efficient *in Vitro* Processing and Is Mediated through the Hydrophobic Regions of NS2B*. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272, No. 49, Issue of December 5, pp. 30715–30723, 1997.
80. Pfeuffer, Thomas. Synthese und Testung von Aza-Peptiden als Cystein- und Aspartat-Protease Inhibitoren sowie Kristallisation und Elektronendichtebestimmung von Aziridin-, Epoxid- und Michael-Akzeptor substituierten Bausteinen. Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg : s.n., 2009.
81. al, Honmei Wu et. Novel and potent Dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors. 2014.
82. Schmitz, Sabine. *Der Experimentator, Zellkultur*, 3. Auflage, S. 197. 2011.
83. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull*. 2002, 25: pp. 1600-3.
84. Rowley SD, Anderson GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant*. 11: pp. 389-93, 1993.
85. Vogel, Martin, et al., et al. Therapie der HIV-Infektion. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 507-16;.
86. Okome-Nkoumou M, Guiyedi V, Ondounda M, Efire N, Clevenbergh P, Dibo M, Dzeing-Ella A. Opportunistic Diseases in HIV-Infected Patients in Gabon following the Administration of Highly Active Antiretroviral Therapy: A Retrospective Study. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 Dec 9.
87. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338:853-60.
88. e.V., Deutsche AIDS-Gesellschaft. Deutsch-Österreichische Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-Infektion (konsentiert Version 2012).

89. Sharon A. Riddler, M.D., M.P.H., Richard Haubrich, M.D., A. Gregory DiRienzo, Ph.D., Lynne Peeples, M.S., etc. Class-Sparing Regimens for Initial Treatment of HIV-1 Infection. *The New England Journal of Medicine*, May 15, 2008, vol. 358, No. 20.
90. Rivas, P., et al. Role of atazanavir in the treatment of HIV infection. *Ther Clin Risk Manag*, 2009. 5: p. 99-116.
91. Katlama C, Valantin MA, Algarte-Genin M, Duvivier C, Lambert-Niclot S, Girard PM, Molina JM, Hoen B, Pakianather S, Peytavin G, Marcelin AG, Flandre P. Efficacy of darunavir/ritonavir maintenance monotherapy in patients with HIV-1 viral suppression: a randomized open-label, noninferiority trial, MONOI-ANRS 136. *AIDS*. 2010 Sep 24; pp. 2365-74.
92. RKI. Hepatitis C RKI-Ratgeber für Ärzte. 20. Dezember 2013.
93. Klibanov OM, Williams SH, Smith LS, Olin JL, Vickery SB. Telaprevir: a novel NS3/4 protease inhibitor for the treatment of hepatitis C. *Pharmacotherapy*. 2011 Oct;31:951-74. .
94. Berman K, Kwo PY. Boceprevir, an NS3 protease inhibitor of HCV. *Clin Liver Dis*. 2009 Aug;13:429-39. doi: 10.1016/j.cld.2009.05.008.
95. Yan Zhu, Song Chen. Antiviral treatment of hepatitis C virus infection and factors affecting efficacy. *World J Gastroenterol* 2013 December 21; 19: 8963-8973.
96. A., Geier. Update Hepatitis C: Was hat sich geändert? Was kommt demnächst? *MMW Fortschr Med*. 2013.
97. Christopher T. Lemke, Nathalie Goudreau and Peter W. White. Combined X-ray, NMR, and Kinetic Analyses Reveal Uncommon Binding Characteristics of the Hepatitis C Virus NS3-NS4A Protease Inhibitor BI 201335. *J Biol Chem*. 2011 April 1; 286: 11434–11443. .
98. Christoph Sarrazin, Thomas Berg, Peter Buggisch, Matthias Dollinger, Holger Hinrichsen, Dietrich Hüppe, Michael Manns, Stefan Mauss, Jörg Petersen, Karl-Georg Simon, Heiner Wedemeyer, Stefan Zeuzem. Aktuelle Empfehlung der DGVS und des bng zur Therapie der chronischen Hepatitis C. 06/2014.
99. Vianney Tricou, Nguyet Nguyen Minh, Jeremy Farrar, Hien Tinh Tran and Cameron P. Simmons. Kinetics of Viremia and NS1 Antigenemia Are Shaped by Immune Status and Virus Serotype in Adults with Dengue. *PLoS Negl Trop Dis*.

2011 September; 5: e1309.

100. Wang WK, Chao DY, Kao CL, Wu HC, Liu YC, et al. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. *Virology*. 2003;305:330–338.

101. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis*. 2000;181:2–9.

102. Libraty DH, Endy TP, Hough HS, Green S, Kalayanarooj S, et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *J Infect Dis*. 2002;185:1213–1221.

103. Jessica R. Fried, Robert V. Gibbons, Siripen Kalayanarooj, Stephen J. Thomas, Anon Srikiatkachorn, In-Kyu Yoon, Richard G. Jarman, Sharone Green, Alan L. Rothman, Derek A. T. Cummings. Serotype-Specific Differences in the Risk of Dengue Hemorrhagic Fever: An Analysis of Data Collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol. 4 Issue 3, p1, March 2010.

104. T. Schiermeister, J. Bodem. (nicht publiziert).

105. Cígler P, Kozísek M, Rezáková P, Brynda J, Otwinowski Z, Pokorná J, Plešek J, Grüner B, Dolecková-Maresová L, Mása M, Sedláček J, Bodem J, Kräusslich HG, Král V, Konvalinka J. From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: metallocarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:15394-9. Epub 2005 Oct 14., 2005 Oct 25.

106. Furet P1, Caravatti G, Lydon N, Priestle JP, Sowadski JM, Trinks U, Traxler P. Modelling study of protein kinase inhibitors: binding mode of staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411. *J Comput Aided Mol Des*. 1995 Dec;9:465-72.

107. Philipp le Coutre, Elena Tassi, Marileila Varella-Garcia, Rossella Barni, Luca Mologni, Gonçalo Cabrita, Edoardo Marchesi, Rosanna Supino, and Carlo Gambacorti-Passerini. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood*: 95. March 1, 2000; .

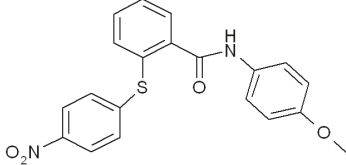
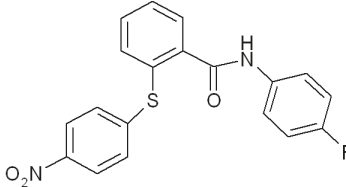
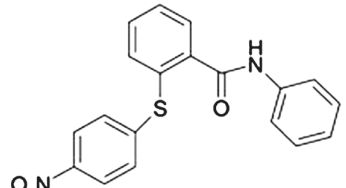
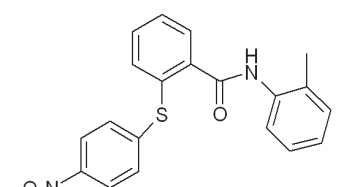
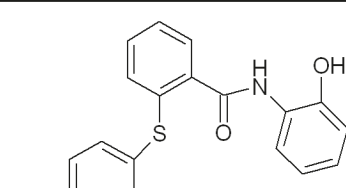
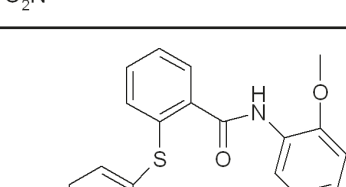
108. Noble, C. G., et al., et al. Ligand-bound structures of the dengue virus protease reveal the active conformation. *J Virol*. 2012, 86, pp. 438-46.

109. Thomas J. Chambers, Chang S. Hahn, Ricardo Galler, I and Charles M.

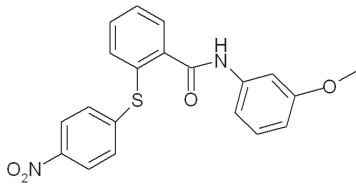
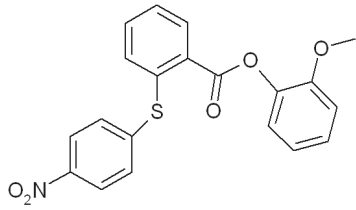
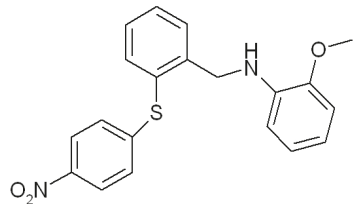
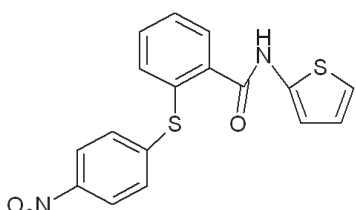
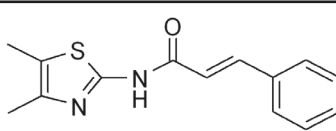
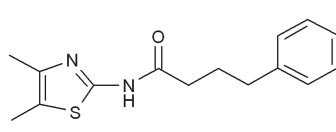
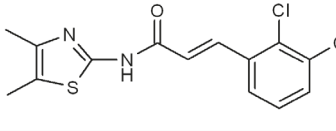
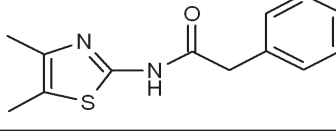
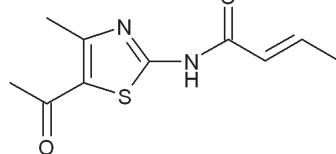
- Rice. Flavivirus Genome Organisation, Expression and Replikation. *Annu. Rev. Microbiol.* 1990. 44:649-88.
110. Sergey A. Shiraev, Igor A. Kozlov, Boris I. Ratnikov, Jeffrey W. Smith, Michal Lebl and Alex Y. Strongin. Cleavage preference distinguishes the two-component NS2B–NS3 serine proteinases of Dengue and West Nile viruses. *Biochem. J.* (2007), pp 743–752. doi:10.1042/BJ20061136, 2007 .
111. Steven C. Pettit, Lorraine E. Everitt, Sumana Choudhury, Ben M. Dunn, and Andrew H. Kaplan. Initial Cleavage of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 GagPol Precursor by Its Activated Protease Occurs by an Intramolecular Mechanism. *Journal of Virology.* Aug. 2004, pp. 8477–8485, Bde. Vol. 78, No. 16.
112. Amarnath Chatterjee, P. Mridula, Ram Kumar Mishra, Rohit Mittal and Ramakrishna V. Hosur. Folding Regulates Autoprocessing of HIV-1 Protease Precursor. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 280, No. 12, Issue of March 25, pp. 11369 –11378, 2005.
113. Steve C Pettit, Jeffrey N Lindquist, Andrew H Kaplan and Ronald Swanson. Processing sites in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates. *Retrovirology* 2005, 2:66 doi:10.1186/1742-4690-2-66.
114. Copeland, Robert A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*, 2nd Edition. 2013, S. 75-76. ISBN: 978-1-118-48813-3.
115. (ECDC), European Centre for Disease Prevention and Control. *Aedes albopictus* distribution maps. Stockholm : s.n., March 2010.
116. Mullis, Kary B. *The polymerase chain reaction*. Boston: Birkhäuser, 1994.
117. Müller-Esterl, Werner. *Biochemie*. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum, 2011. S. 149-152.
118. F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Band 74, 1977, S. 5463–5467.

7. Anhang

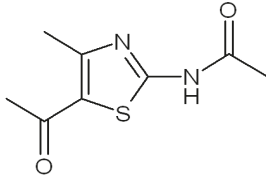
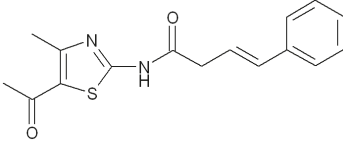
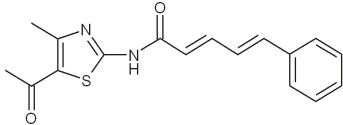
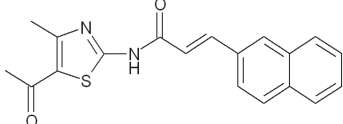
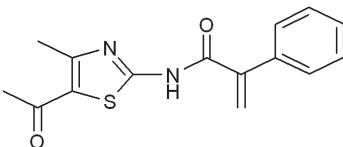
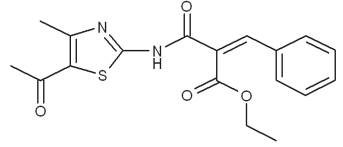
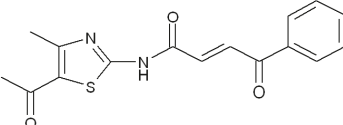
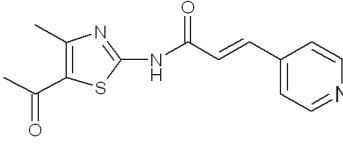
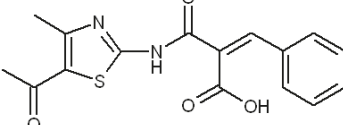
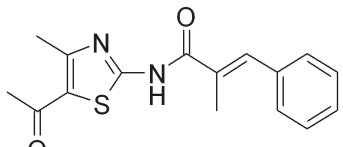
7.1 Inhibitorenverzeichnis

№	Name	Struktur	MW [g/mol]	Konzentration [μ M]	Hem- mung [%]
1.	FM 03		380,42	20	7
2.	FM 04		368,32	20	14
3.	FM 05		350,4	20	12
4.	FM 06		364,42	20	16
5.	FM 07		366,4	20	24
6.	FM 08		350,44	20	22

Anhang

7.	FM 29		380,42	20	12
8.	FM 35		381,41	20	5
9.	FM 36		366,44	20	22
10.	FM 47		356,43	50	39
11.	MH 158A		258,34	40	11
12.	MH 164		274,39	50	3
13.	MH 165		327,23	50	23
14.	MH 168		246,33	50	13
15.	MH 175D		224,28	40	14

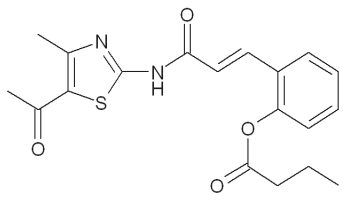
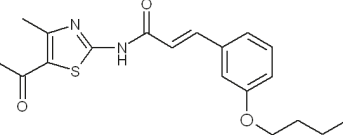
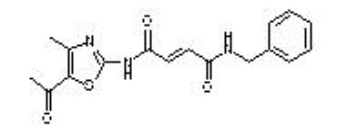
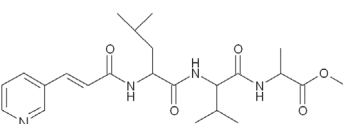
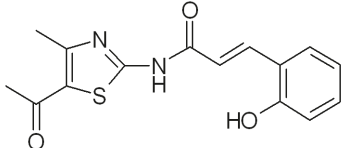
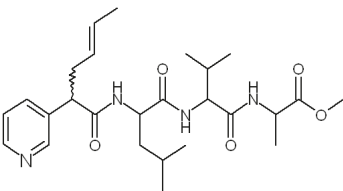
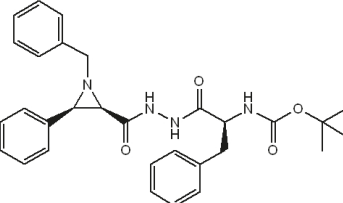
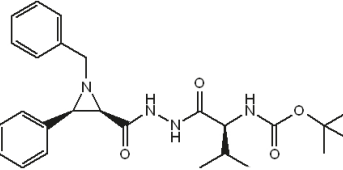
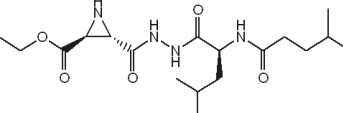
Anhang

16.	MH 182A		198,25	40	0
17.	MH 194		300,38	50	27
18.	MH 199B		312,39	40	32
19.	MH 202C		336,42	40	31
20.	MH 207		286,36	50	40
21.	MH 209B		358,42	40	20
22.	MH 211		314,37	50	0
23.	MH 214		287,34	50	45
24.	MH 221		330,36	50	31
25.	MH 223		302,4	50	43

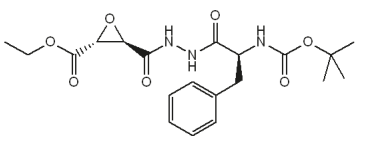
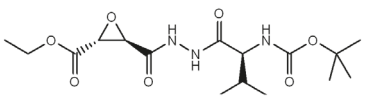
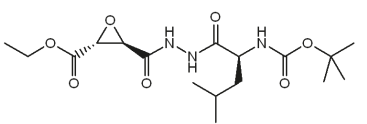
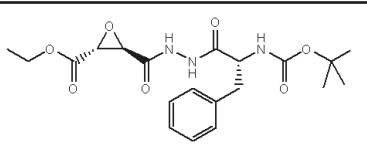
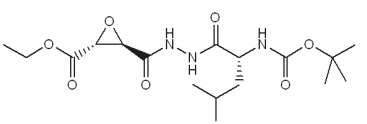
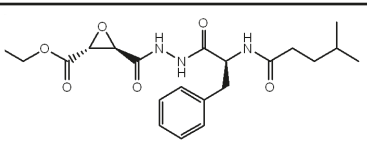
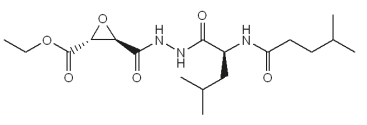
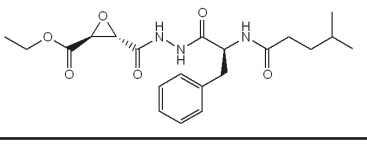
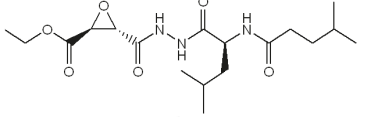
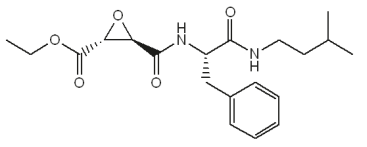
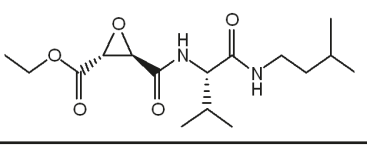
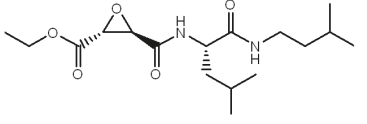
Anhang

26.	MH 231		316,33	20	19
27.	MH 232C		346,41	40	29
28.	MH 240		284,38	20	18
29.	MH 256E		302,35	40	11
30	MH 257		372,45	50	38
31.	MH 266B		316,38	50	35
32.	MH 270		420,53	20	43
33.	MH 272A		288,33	40	23
34.	MH 286		302,35	50	47

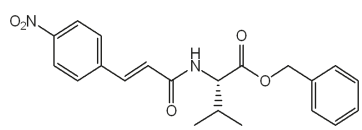
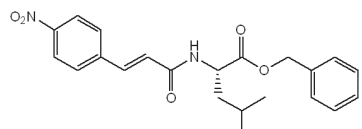
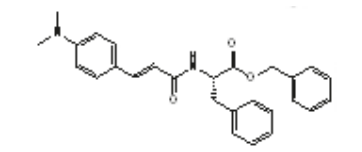
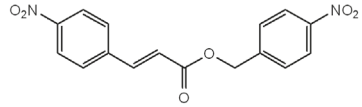
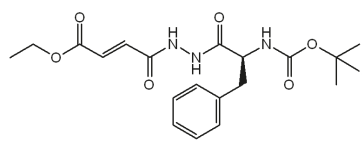
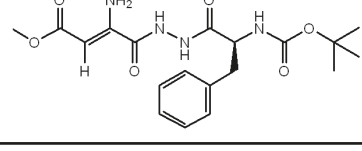
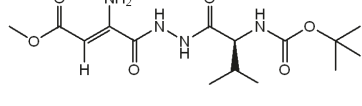
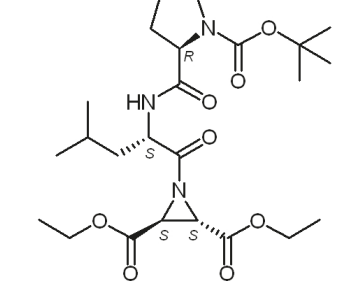
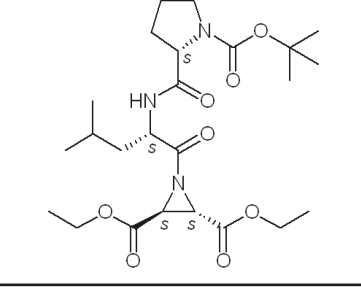
Anhang

35.	MH 288		372,45	50	30
36.	MH 300A		358,46	40	35
37.	MH 313A		343,41	40	47
38.	MH 335		524,67	20	28
39.	MH 356		488,63	20	32
40.	MH 362		488,63	20	49,3
41.	TP 06		514,62	50	4
42.	TP 07		466,57	50	6
43.	TP 08		384,24	50	14

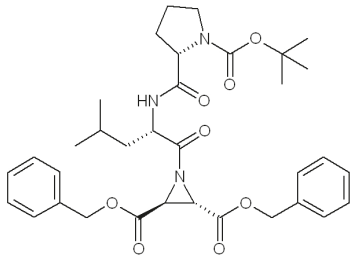
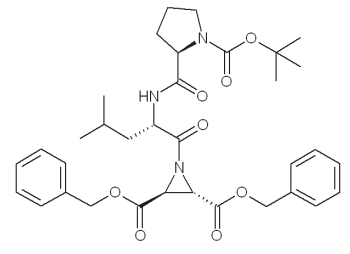
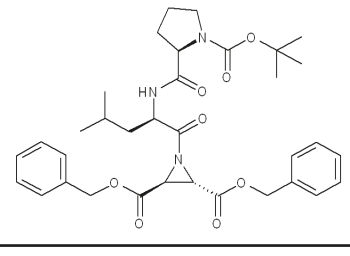
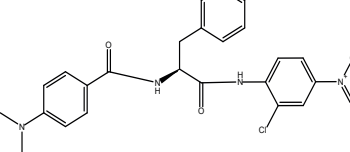
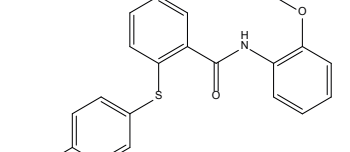
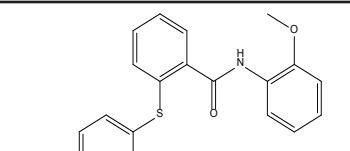
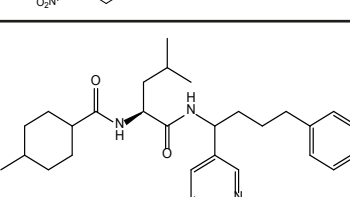
Anhang

44.	TP 09		421,19	50	17
45.	TP 10		373,4	50	22
46.	TP 11		387,43	50	24
47.	TP 12		421,44	50	7
48.	TP 13		387,43	50	0
49.	TP 14		419,47	50	8
50.	TP 16		385,46	50	13
51.	TP 17		419,47	50	24
52.	TP 18		385,46	50	10
53.	TP 19		376,447	50	8
54.	TP 20		328,404	50	10
55.	TP 21		352,47	50	14

Anhang

67.	TP 36		382,14	50	22
68.	TP 37		340,15	50	18
69.	TP 38		428,52	50	52
70.	TP 39		328,28	50	33
71.	TP 40		405,38	50	5
72.	TP 41		406,43	50	22
73.	TP 42		358,39	50	22
74.	CS 116		497,58	50	5
75.	CS 118		497,58	50	10

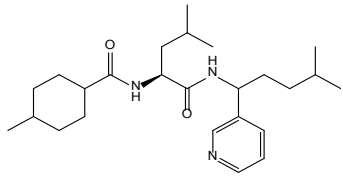
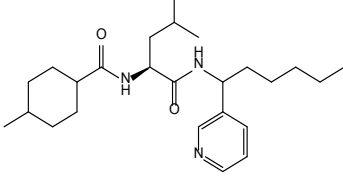
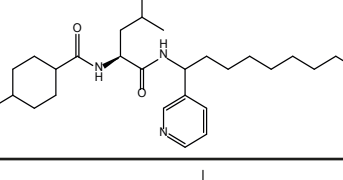
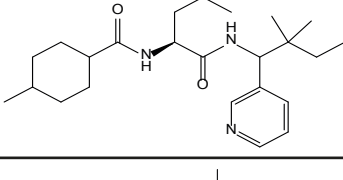
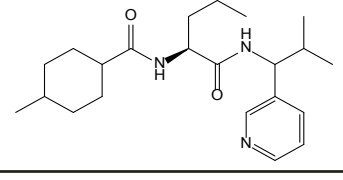
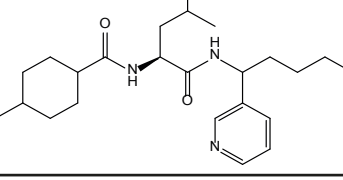
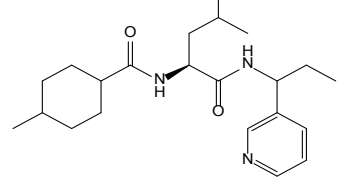
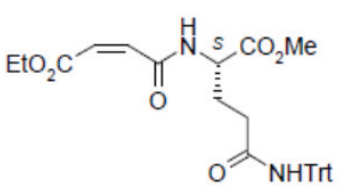
Anhang

76.	CS 134		621,72	50	21
77.	CS 135		621,72	50	19
78.	CS 136		621,72	50	24
79.	TS 16		466,9	20	0
80.	TS 23		380,4	20	7
81.	TS 48		385,48	20	19
82.	TS 170		449,63	20	7

Anhang

83.	TS 171		441,65	20	11
84.	TS 172		415,61	20	13
85.	TS 173		387,56	20	24
86.	TS 174		385,54	20	17
87.	TS 175		399,57	20	7
88.	TS 189		429,64	20	17
89.	TS 190		401,5	20	15
90.	TS 191		427,62	20	20

Anhang

91.	TS 192		415,61	20	27
92.	TS 203		415,6	20	10
93.	TS 204		457,7	20	14
94.	TS 205		415,6	20	13
95.	TS 206		387,6	20	18
96.	TS 207		387,6	20	25
97.	TS 208		373,5	20	24
98.	Z0123		528,61	50	5

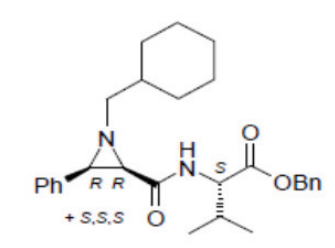
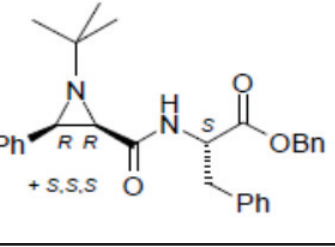
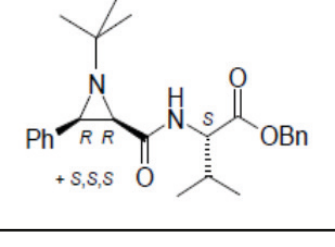
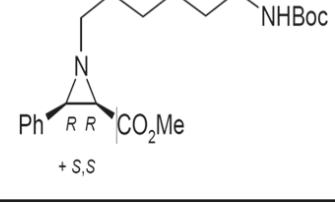
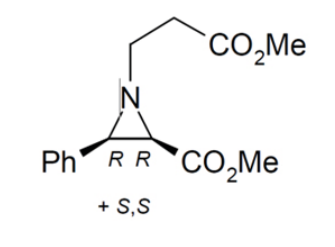
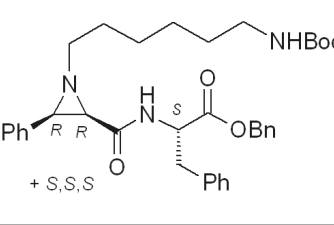
Anhang

99.	E0123		514,58	50	8
100.	Cy 02		443,55	50	14
101.	Cy 01		281,36	50	17
102.	CBA 31		442,56	50	4
103.	CBA 32		484,64	50	5
104.	CBA 33		436,6	50	8
105.	CBA 34		456,59	50	9
106.	CBA 35		408,55	50	16

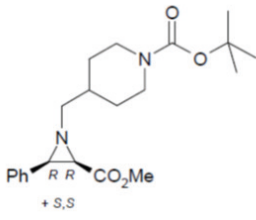
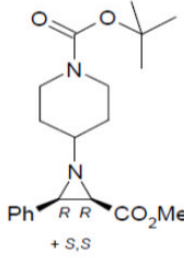
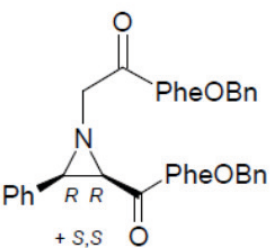
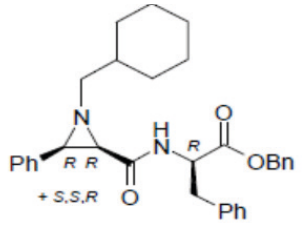
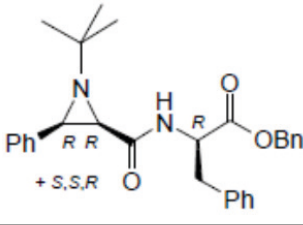
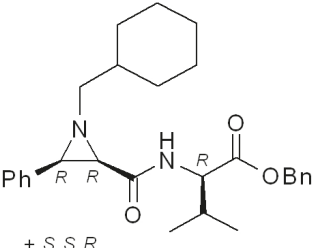
Anhang

107.	CBA 36	<p>oder R,S,S,S</p>	504,63	50	17
108.	CBA 37	<p>or S,S,S,S</p>	504,63	50	11
109.	CBA 38	<p>oder R,S,S,S</p>	456,59	50	23
110.	CBA 39	<p>oder S,S,S,S</p>	456,59	50	25
111.	CBA 40	<p>+ S,S,S</p>	456,59	50	3
112.	CBA 42	<p>+ S,S,S</p>	456,59	50	4
113.	CBA 44	<p>+ S,S,S</p>	408,55	50	12

Anhang

114.	CBA 45	 +s,s,s	448,61	50	13
115.	CBA 46	 +s,s,s	456,59	50	14
116.	CBA 47	 +s,s,s	408,55	50	17
117.	CBA 49	 +s,s	376,5	50	24
118.	CBA 51	 +s,s	263,3	50	12
119.	CBA 52	 +s,s,s	599,78	50	17

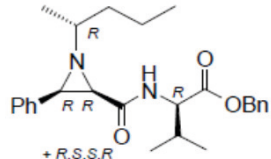
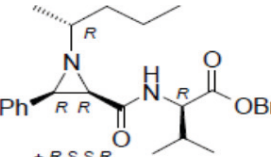
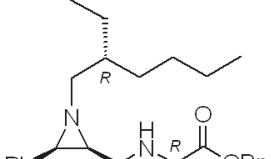
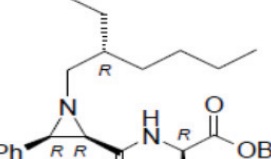
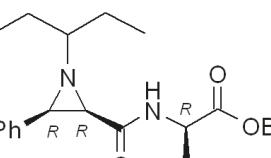
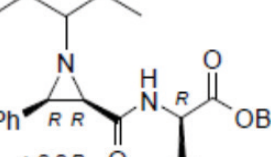
Anhang

120.	CBA 53	 Ph <i>R R</i> CO ₂ Me + S,S	374,48	50	10
121.	CBA 54	 Ph <i>R R</i> CO ₂ Me + S,S	360,46	50	14
122.	CBA 56	 Ph <i>R R</i> + S,S	695,82	50	24
123.	CBA 57	 Ph <i>R R</i> + S,S,R	496,66	50	23
124.	CBA 58	 Ph <i>R R</i> + S,S,R	456,59	50	26
125.	CBA 59	 Ph <i>R R</i> + S,S,R	448,61	50	6

Anhang

126.	CBA 60	<p>+ s,s,s</p>	549,72	50	17
127.	CBA 61	<p>+ s,s,s</p>	535,69	50	19
128	CBA 62	<p>+ s,s,s</p>	597,76	50	0
129.	CBA 63	<p>+ s,s,s</p>	583,73	50	8
130.	CBA 76a	<p>+ R,S,S,R oder S,R,R,R + S,S,S,R</p>	470,62	50	23
131.	CBA 76b	<p>+ R,S,S,R oder S,R,R,R + S,S,S,R</p>	470,62	50	21

Anhang

132.	CBA 77a	 <p>+ R,S,S,R oder S,R,R,R + S,S,S,R</p>	422,57	50	25
133.	CBA 77b	 <p>+ R,S,S,R oder S,R,R,R + S,S,S,R</p>	422,57	50	9
134.	CBA 78	 <p>+ R,S,S,R + S,R,R,R + S,S,S,R</p>	512,7	50	11
135.	CBA 79	 <p>+ R,S,S,R oder S,R,R,R + S,S,S,R</p>	464,65	50	34
136.	CBA 80	 <p>+ S,S,R</p>	470,62	50	19
137.	CBA 81	 <p>+ S,S,R</p>	422,57	50	0

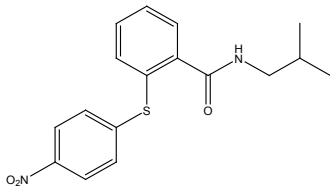
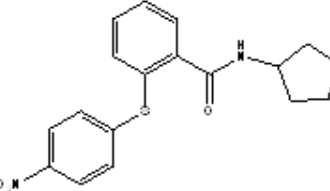
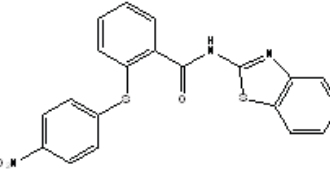
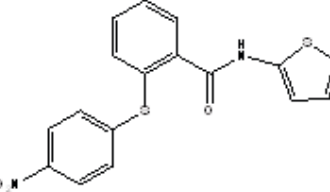
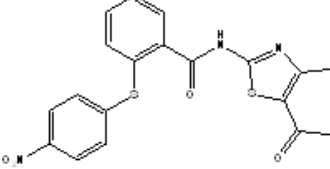
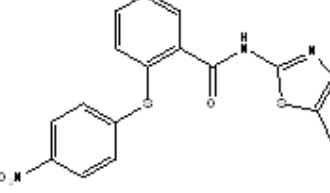
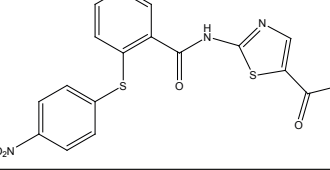
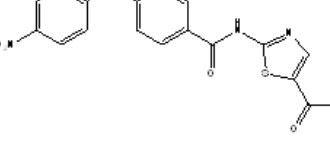
Anhang

138.	CBA 82	<p>+S,S,R</p>	498,67	50	8
139.	CBA 83	<p>+S,S,R</p>	450,63	50	14
140.	CBA 84	<p>+ R,S,S,R oder + S,R,R,R + S,S,S,R</p>	498,67	50	23
141.	CBA 85	<p>+ R,S,S,R oder S,R,R,R + S,S,S,R</p>	450,63	50	15
142.	CBA 86	<p>+ R,S,S,R oder S,R,R,R + S,S,S,R</p>	498,67	50	7
143.	CBA 88	<p>+S,S,S</p>	424,5	50	26
144.	CBA 89	<p>+S,S,S</p>	472,55	50	8

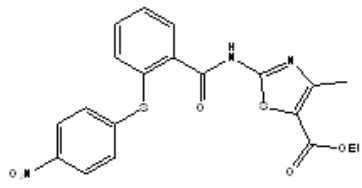
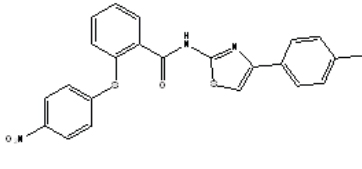
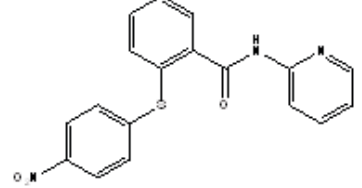
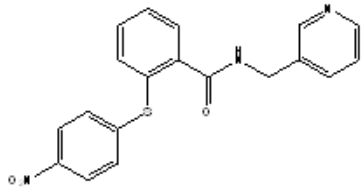
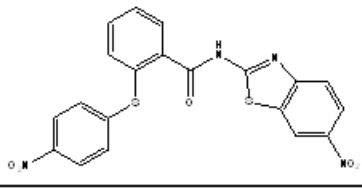
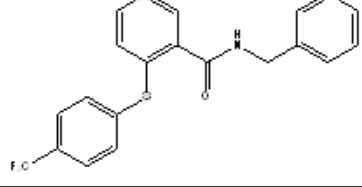
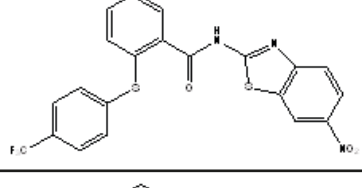
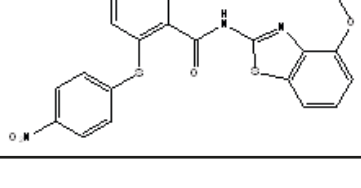
Anhang

145.	HWu 3f		385,54	50	29
146.	HWu 4		371,43	50	35
147.	HWu 8		341,45	50	15
148.	HWu 9a		355,48	50	16
149.	HWu 11		402,4	50	54
150.	HWu 12		314,36	50	20
151.	HWu 14		357,41	50	34
152.	HWu 15		316,37	50	29

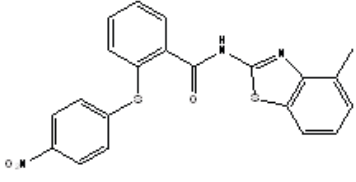
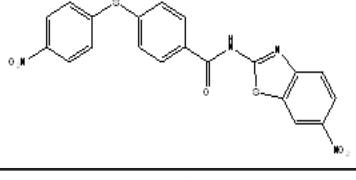
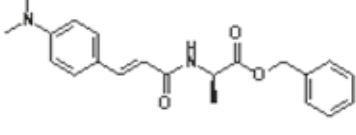
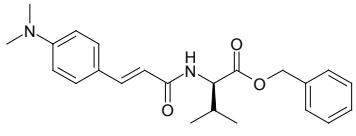
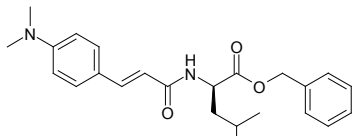
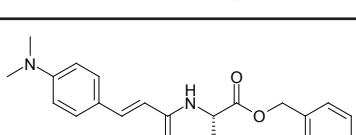
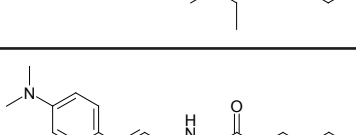
Anhang

153.	HWu 17		330,4	50	28
154.	HWu 19		342,41	50	26
155.	HWu 20		407,46	50	41
156.	HWu 21		356,42	50	38
157.	HWu 29		413,47	50	36
158.	HWu 31		371,43	50	34
159.	HWu 34		385,42	50	47
160.	HWu 44		385,42	50	47

Anhang

161.	HWu 46		443,5	50	30
162.	HWu 47		447,53	50	29
163.	HWu 49		351,38	50	21
164.	HWu 50		365,41	50	3
165.	HWu 51		452,46	50	69
166.	HWu 53		388,41	50	0
167.	HWu 62		475,46	50	66
168.	HWu 63		437,49	50	21

Anhang

169.	HWu 64		421,49	50	22
170.	HWu 69		452,46	50	38
171.	SH 01		352,43	50	46
172.	SH 02		380,48	50	50
173.	SH 03		394	50	57
174.	SH 04		394,5	50	55
175.	SH 05		380,5	50	61

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regionen mit Dengue Transmissionsrisiko.....	2
Abbildung 2: Ausbreitung von DENV3 in Lateinamerika in den Jahren 1994-2001	3
Abbildung 3: Verbreitung von Aedes albopictus und Aedes aegypti in Europa, Jan. 2014	4
Abbildung 4: Organisation des Dengue Virus RNA Genoms; DENV Polyprotein mit Proteincodierenden Regionen und Schnittstellen; DENV Vermehrungszyklus	9
Abbildung 5: Katalysemechanismus einer Serinprotease	11
Abbildung 6: Kristallographische Struktur von NS3pro- und des NS2B-NS3pro-Proteins.....	11
Abbildung 7: Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H.....	13
Abbildung 8: BP2109	14
Abbildung 9: NITD008	14
Abbildung 10: Geräteeinstellungen für PCR	23
Abbildung 11: Geräteeinstellungen für Sequenzierung	34
Abbildung 12: Schema der Western-Blot-Aufbau.....	40
Abbildung 13: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.....	47
Abbildung 14: Auftragung nach Lineweaver-Burk	47
Abbildung 15: Lineweaver-Burk-Auftragung bei kompetitiver Hemmung	48
Abbildung 16: Lineweaver-Burk-Auftragung bei nicht kompetitiver Hemmung ..	48
Abbildung 17a-c: Fluoreszenzlöschung und Eigenfluoreszenz des Inhibitors in einem Enzym-„Assay“	52
Abbildung 18: PCR-amplifizierte DENV2-Proteasesequenzen	56
Abbildung 19: Restriktionsverdau von pET200/D-TOPO mit DENV2-Proteaseinserts ...	57
Abbildung 20: Verdau von pET101/D-TOPO mit NS2B-„Insert“	57
Abbildung 21: Nachweis der NS3pro-Expression mittels Western-Blot nach einer denaturierenden Proteinaufreinigung.....	59
Abbildung 22: Nachweis der NS2B-Expression mittels Western-Blot nach einer denaturierenden Proteinaufreinigung	59

Abbildung 23: Nachweis der NS3pro- und NS2B-Expression mittels Western-Blot nach einer denaturierenden Proteinaufreinigung	59
Abbildung 24: Nachweis der NS3pro-Expression mittels Western-Blot nach einer nativen Proteinaufreinigung	61
Abbildung 25: Schematische Darstellung des DENV2-Proteasekonstruktes	62
Abbildung 26: Nachweis der NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Proteinexpression mittels Coomassie-Färbung nach einer nativen Proteinaufreinigung	62
Abbildung 27a-c: Aktivitätsprüfung von NS3pro-Protease mittels Photometrie mit L-BAPA als Substrat	64
Abbildung 28: Aktivitätsprüfung von NS2B-Gly-Linker-NS3pro-Protease mittels Fluorometrie mit Boc-Gly-Arg-Arg-AMC als Substrat.....	65
Abbildung 29: Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Km-Wertes	65
Abbildung 30: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für MH 313, TP 38, MH 214 ..	67
Abbildung 31: FM 47. Lineweaver-Burk-Auftragung.....	68
Abbildung 32: MH 214. Lineweaver-Burk-Auftragung.....	69
Abbildung 33: TP38. Lineweaver-Burk-Auftragung	70
Abbildung 34: HWu 62. Verdünnungsreihe zur IC ₅₀ -Bestimmung	72
Abbildung 35: HWu 62. Verdünnungsreihe zur IC ₅₀ -Bestimmung. Enzymwirkung in Prozent.....	73
Abbildung 36: HWu 62. Lineweaver-Burk-Auftragung	74
Abbildung 37: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für HWu 11, HWu 20, HWu 29, HWu34.....	76
Abbildung 38: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für HWu 11, HWu 20, HWu 29, HWu34 bei verminderter DMSO-Konzentration	76
Abbildung 39: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für HWu 44, HWu 50, HWu 51, HWu 62	76
Abbildung 40: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für HWu 44, HWu 50, HWu 51, HWu 62 bei verminderter DMSO-Konzentration	77
Abbildung 41: Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung für SH 05.....	77
Abbildung 42: Beurteilung der Hemmwirkung von HWu 62-51-11 mittels Fluoreszenzspektrometrie	82

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Familie Flaviviridae.....	1
Tabelle 2: Peptidinhhibitoren der DENV NS3pro-Protease.....	13
Tabelle 3: Konzentrationsabhängige Trennbereiche der Agarosegele.....	31
Tabelle 4: Akrylamidkonzentrationabhängige Trennbereiche der Polyacrylamid-gele	38
Tabelle 5: Inhibitorverdünnungsschema.....	54
Tabelle 6: Rechnerisch ermitteltes Molekulargewicht der exprimierten Proteine....	60
Tabelle 7: Nach Bradford-Methode ermittelte Proteinkonzentration	63
Tabelle 8: Übersicht der getesteten DENV2-wirksamen Verbindungen.....	66
Tabelle 9: FM 47. Km- und Vmax-Werte	68
Tabelle 10: MH 214. Km- und Vmax-Werte.....	69
Tabelle 11: TP 38. Km- und Vmax-Werte	70
Tabelle 12: Übersicht der getesteten FM 47 Derivate	71
Tabelle 13: Übersicht der getesteten TP 38 Derivate.....	72
Tabelle 14: IC ₅₀ -Werte ausgewählter Inhibitoren	73
Tabelle 15: HWu 62. Km- und Vmax-Werte	74
Tabelle 16: Zytotoxizitätsmessung ausgewählter Inhibitoren.....	75
Tabelle 17: Beurteilung der Zytotoxischen Wirkung der DMSO.....	78
Tabelle 18: Visuelle Beurteilung der Inhibitoren HWu 11, 20, 29, 34, 44, 50, 51, 62 und SH 05 bezüglich ihrer Hemmung der viralen Replikation bei Konzentrationen 20, 5, 2,5 µM.....	79
Tabelle 19: Visuelle Beurteilung des Aprotinins bezüglich seiner Hemmeigenschaften <i>in vivo</i>	80
Tabelle 20: Visuelle Beurteilung der Inhibitoren HWu 11, 51 und 62 bezüglich Hemmung der viralen Replikation bei Konzentrationen 2,5, 1,0, 0,5, 0,1, 0,05 µM.	81
Tabelle 21: Zusammenfassung der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Analysen ausgewählter Inhibitoren.....	83

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die zur erfolgreichen Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Axel Rethwilm für die Möglichkeit am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg meine Doktorarbeit machen zu dürfen.

Ganz besonders danke ich Priv.-Doz. Dr. Jochen Bodem für seine hervorragende Betreuung, Hilfsbereitschaft, Motivation und Geduld gegenüber medizinischen Doktoranden.

Vielen herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Tanja Schirmeister und ihre Arbeitsgruppe für die Unterstützung und Bereitsstellung der Proteaseinhibitoren und Messgeräte für meine Versuche. Besonderer Dank an die technische Assistentin der Arbeitsgruppe Cornelia Heindl, die mir das Arbeiten mit den Geräten beigebracht hat und bei jedem Problem zur Seite stand.

Den Kollegen aus der Arbeitsgruppe Bodem danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und hilfreiche kompetente Ratschläge.

Meiner Familie und meinem Freund danke ich für die moralische Unterstützung und Ermunterungen trotz alle Schwierigkeiten weiter zu machen.

Lebenslauf

Zur Person

Mariya Snitko
geboren am 30 Oktober 1983
in St. Petersburg (Russland)

Schulbildung

09.1990 – 06.2000
Mittelschule, Tschernovitz, Ukraine, Mittlere Reife

02.2004 – 02.2006
Matthias-Grünwald-Gymnasium, Würzburg
Allgemeine Hochschulreife

Studium

10.2006 – 11.2012
Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
Humanmedizin, Staatsexamen

04.2009 - 09.2013
Medizinische Doktorandin am Institut für Virologie und Immun-
biologie, Würzburg

Berufstätigkeit

seit 04.2013 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin
des Caritas-Krankenhaus Bad Mergentheim